

Zum Mechanismus der Kondensationsreaktion der Fettsäurebiosynthese

Klaus-Ingo Arnstadt

1973

ZUM MECHANISMUS DER KONDENSATIONSREAKTION
DER FETTSÄUREBIOSYNTHESE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Klaus-Ingo Arnstadt

aus

München

1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 1973

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1968 bis Juli 1972 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen am Biochemischen Institut der Universität München und am Max-Planck-Institut für Zellchemie ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. F. Lynen danke ich herzlich für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir gewährte.

Frau G. Schindlbeck danke ich für ihre wertvolle und geschickte Mitarbeit seit März 1971.

Mein Dank gilt ferner: Herrn H. Huber für die Aufnahme der NMR-Spektren und die zuverlässigen NMR-spektroskopischen Messungen zur Kinetik des Wasserstoff-Deuterium-Austausches von S-Malonyl-N-acetylcysteamin; Herrn Dr. H. Oberheiden, Farbenfabriken Bayer AG, für die Überlassung und Sendung von E. coli-Bakterien; Herrn Prof. Dr. G. Binsch für die anregende Diskussion der Versuchsergebnisse.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. I. Kinetischer Isotopeneffekt bei der Fettsäuresynthese	10
1. NMR-spektroskopische Untersuchung des Wasserstoff- Deuterium-Austausches von Methylenprotonen eines Malon- säure-monothioesters	10
2. Darstellung und Stabilität von di-Deutero-malonyl-Coenzym A	18
3. Enzymatische Untersuchungen mit D-Malonyl-Coenzym A	19
a) D-Malonyl-CoA im Aktivitätstest der Fettsäure-Synthetase aus Hefe	19
b) pH-Abhängigkeit und Lösungsmittel-Isotopeneffekt in D ₂ O	21
II. Studium des Isotopenaustausches während der Kondensationsreaktion ..	24
1. Isolierung von β -Hydroxybuttersäure	25
a) Isolierung als kristallisierbares Derivat	25
b) Gaschromatographische Reinigung	26
2. Versuche mit der Fettsäure-Synthetase aus Hefe	33
3. Untersuchungen mit Enzymen des Fettsäuren synthetisierenden Systems von Escherichia coli-Bakterien	35
a) Anreicherung einzelner Komponenten des Synthese-Systems ..	35
b) Darstellung von "Acyl Carrier Protein"-Derivaten	41
c) Kinetischer Isotopeneffekt von D-Malonyl-ACP?	42
d) Untersuchung des Einbaus von Protonen aus dem Lösungs- mittel	43
e) Die Kondensations-Reaktion mit tritiiertem Malonyl-ACP	45
III. Zusammenfassende Diskussion	47
C. Experimentelle Einzelheiten	53
1. Geräte	53
2. Materialien	54
3. Synthetisierte und isolierte Präparate	54
4. Allgemeine analytische Methoden	56
5. Zu Kapitel B I	56
a) NMR-spektroskopische Messung des H-D-Austausches von S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin	56

	Seite
b) Darstellung von di-Deutero-malonyl-CoA	57
c) Zum pK-Wert von S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin	57
6. Zu Kapitel B II	58
a) Synthese von β -Hydroxybuttersäure-p-phenyl-phenacylester . .	58
b) Gaschromatographische Analyse	58
α) Vorbereitung der Säulen	58
β) Gaschromatographie	59
γ) Radiogaschromatographie	59
δ) Darstellung von Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure .	60
ϵ) Darstellung von Crotonsäure-trimethylsilylester	61
c) Kaliumborhydrid-Reduktion als Abfangreaktion von enzymatisch gebildetem Acetoacetyl-thioester	61
d) Malonyl-CoA- $^{14}\text{CO}_2$ -Austausch zur Bestimmung von ACP	62
e) Anreicherung von "Acyl Carrier Protein"	65
f) β -Ketoacyl-ACP-Reduktase: Bestimmung und Anreicherung . .	68
g) Kondensierendes Enzym: Bestimmung und Anreicherung	69
h) β -Hydroxy-acyl-ACP-Dehydratase: Bestimmung und Anreicherung	70
i) Acyl Carrier Protein-Derivate: Darstellung und Bestimmung. .	70
j) Bestimmung der Ausbeute bei der Isolierung von β -Hydroxybuttersäure aus der Inkubationsmischung	74
D. Zusammenfassung	76
E. Literaturverzeichnis	78

Verwendete Abkürzungen

ACP	"Acyl Carrier Protein"
ATP	Adenosintriphosphat
β -OH-B.S.	β -Hydroxybuttersäure, β -Hydroxybutyryl-
BSA	Bis-trimethylsilyl-acetamid
^{14}C	Kohlenstoffisotop 14
CoA, CoASH	Coenzym A
D	Deuterium
DEAE	Diäthylaminoäthyl-Rest
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DPNH	Diphosphopyridin-nucleotid, reduziert; Nicotinamid-adenindinucleotid, reduziert
ΔE	Extinktionsänderung
E, mE	Extinktion, Einheit, Millieinheit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FR A	= Fraktion A, Enzymfraktion A: Ammoniumsulfat-Fraktion des E.coli-Rohextraktes von 40-75%
FSS	Fettsäuresynthetase aus Hefe
F-6-P	Fructose-6-Phosphat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
^3H	Tritium
lpm	(vom Szintillationszähler registrierte) Impulse pro Minute
m	milli
μ	mikro
Mal-CoA	Malonyl-Coenzym A
min	Minute
NPGS	Neopentylglykol-succinat
NMR	Kernmagnetische Resonanz
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rpm	Umdrehungen pro Minute
Stde.	Stunde
T	Tritium

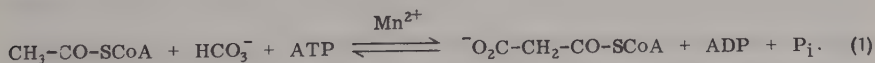
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit
THO, HOT	tritiertes Wasser
TMS	Tetramethylsilan
TMS-	Trimethylsilyl-Rest
TMCS	Trimethylchlorsilan
TPN ⁺	Triphospho-pyridin-nucleotid, Nicotinamid-adenin- dinucleotidphosphat
TPNH	dgl., reduziert
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

A. Einführung

Zur Synthese langkettiger Fettsäuren bedient sich die lebende Zelle einfacher C₂-Einheiten, die durch wiederholte Kondensation miteinander verbunden werden. SONDERHOFF und THOMAS sowie RITTENBERG und BLOCH konnten den Einbau von Essigsäure, die mit Kohlenstoff-13 und Deuterium markiert war, in Fettsäuren nachweisen (1, 2).

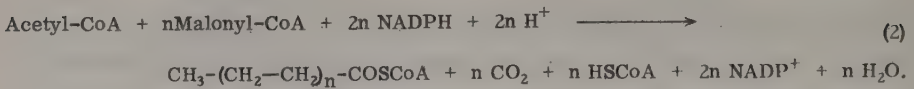
Nachdem LYNEN bei der Aufklärung der Fettsäureoxidation im Acetyl-Coenzym A die "aktivierte Essigsäure" gefunden hatte (3), lag die Annahme nahe, Fettsäuren würden in einfacher Umkehrung des Abbaus mit Hilfe der gleichen Enzyme durch Verknüpfung von Acetyl-Coenzym A synthetisiert. Tatsächlich können Enzyme der Fettsäureoxidation die Synthese von höheren Acyl-CoA-Verbindungen aus Acetyl-CoA katalysieren (4). Dies ist jedoch nur für das Fettsäuren synthetisierende System der Fall, das in den Mitochondrien lokalisiert ist. Als Substrate werden dazu neben Acetyl-CoA Acyl-CoA-Derivate mittlerer Kettenlänge benötigt. Es findet nur eine Kettenverlängerung statt. Die de-novo-Synthese von Fettsäuren aus der "aktivierten Essigsäure" dagegen nimmt einen anderen Weg und läuft an einem anderen Ort innerhalb der Zelle, nämlich im cytoplasmatischen Raum ab (5, 6).

Die Beobachtung der Bicarbonat-Abhängigkeit der Fettsäuresynthese führte zur Entdeckung von Malonyl-CoA als deren Zwischenprodukt (LYNEN, 6; WAKIL, 7; BRADY, 8). Es gibt zwar auch andere Malonyl-CoA-Quellen, die direkte Carboxylierung von Acetyl-CoA in einer ATP-abhängigen Reaktion jedoch ist die im Säugetierorganismus bedeutendste:



Auf dieser ersten Stufe in der zu Fettsäuren bzw. Fettsäure-CoA-Verbindungen führenden Reaktionskette erfolgt die Regulation der Fettsäuresynthese (9). Die Zwischenschaltung von Malonyl-CoA bringt neben dem regulatorischen einen energetischen Vorteil. Die Energie einer Pyrophosphat-Bindung des ATP wird teilweise durch CO₂ auf Acetyl-CoA übertragen, das in dieser "aktivierten" Form als Malonyl-CoA wesentlich besser mit einem anderen Molekül Acetyl- oder Acyl-CoA reagiert (14). Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion ist um den Faktor 10³ größer als bei der Kondensation von Acyl-CoA mit Acetyl-CoA durch Thiolase (10).

Die Fettsäuresynthese läßt sich summarisch mit Gleichung (2) wiedergeben:



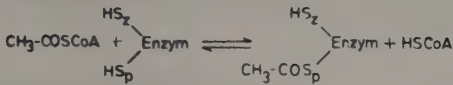
Die Endprodukte sind langkettige freie Fettsäuren (bei tierischen und pflanzlichen Enzymsystemen) oder deren Thioester: bei Hefe und Flagellaten die Acyl-CoA-Derivate, bei E.coli-Bakterien die Acyl-ACP-Derivate (Acyl-"Acyl-Carrier-Protein"). Fettsäuren synthetisierende Systeme aus Hefe, Mycobacterium phlei, Tauben-, Ratten- und Schweineleber konnten als Multienzym-Komplexe isoliert werden (11-14). Aus anderen Organismen dagegen, wie E.coli und Clostridium kluyveri gelang nur die Isolierung von Einzelenzymen (11). Es ist anzunehmen, daß sie auch hier in der intakten Zelle als Multienzym-Komplexe organisiert sind, diese Komplexe jedoch während der Isolierung in die Komponenten zerfallen. Das heißt, allgemein läuft der Syntheseprozess nach dem gleichen Prinzip ab, das LYNEN zuerst beim Studium der Fettsäuresynthetase aus Hefe aufgeklärt hatte (14). Die Fettsäuresynthetase aus Hefe - ein stabiler Enzymkomplex - besteht wahrscheinlich aus mehreren Subkomplexen, die wiederum einen vollständigen Satz der zur Fettsäuresynthese notwendigen Teilenzyme besitzen (15). Eine zentrale Rolle innerhalb einer funktionellen Einheit spielt dabei das von WILLECKE aus dem Enzym-Verband herausgespaltene und isolierte "Acyl-Carrier-Protein" (16), dessen Existenz zuerst im E.coli-Fettsäuresynthese-System entdeckt worden war (17, 18). Es übt mit seinem serinegebundenen 4-Phosphopantethein-Rest eine Trägerfunktion aus. An seiner Thiolgruppe, der "zentralen" SH-Gruppe (-HS_Z), bleiben die Zwischenstufen während eines Synthesesyklus kovalent gebunden und werden von Teilenzym zu Teilenzym transportiert (19).

Die einzelnen Reaktionen im Verlauf der Fettsäuresynthese sind in Abb. 1 dargestellt.

Sie beginnen mit der Übertragung eines Acetylrestes von Acetyl-CoA auf die Serinhydroxylgruppe der Acetyltransferase (20), die ihn über die "zentrale" SH-Gruppe der ACP-Einheit zur "peripheren" SH-Gruppe (HSp) weiterreicht. Die "periphere" SH-Gruppe gehört zu einem Cysteinrest des kondensierenden Enzyms. Kondensation dieses Acetylrestes mit einem auf die zentrale SH-Gruppe übertragenen Malonylrest führt unter Decarboxylierung zum ACP-gebundenen Acetoacetylrest, der mit NADPH zum β-Hydroxybutyryl-Rest reduziert, durch Dehydratisierung und erneute Reduktion zum

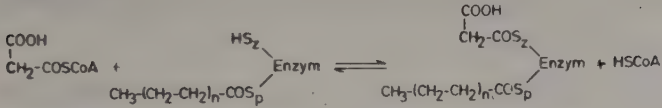
Startreaktion:

Acetyl-Transfer

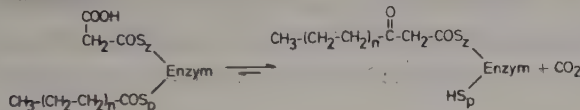


Kettenverlängerung:

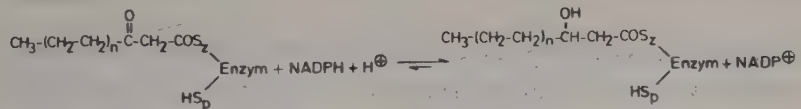
1) Malonyl-Transfer:



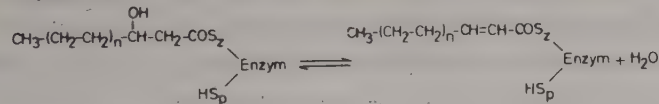
2) Kondensation:



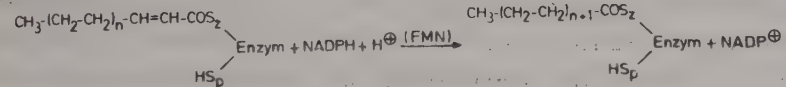
3) 1. Reduktion:



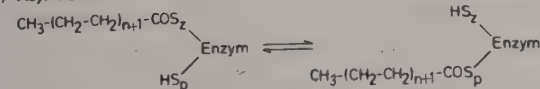
4) Dehydratation.



5) 2. Reduktion:



6) Acyl-Transfer:



Abschlussreaktion

Palmityl-Transfer

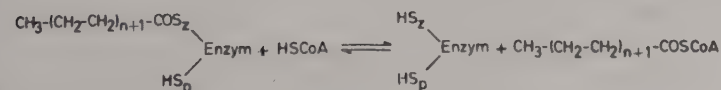


Abb. 1 Reaktionsschema der Fettsäuresynthese am Multienzym-Komplex (15, 19)

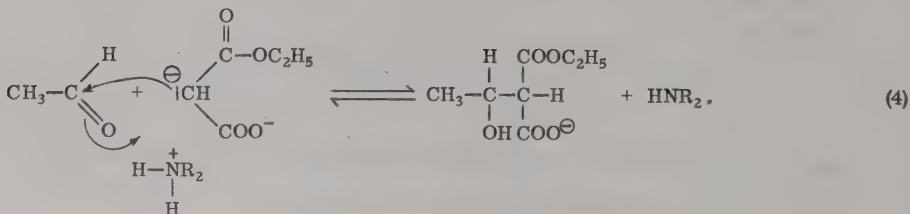
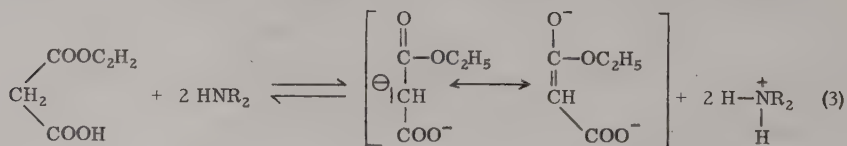
HS_z^- = „zentrale“ SH-Gruppe, HS_p^- = „periphere“ SH-Gruppe

Butyrylrest umgewandelt wird. Nach der Rückübertragung dieses gesättigten Acylrestes auf die "periphere" SH-Gruppe des Enzyms wird deren "zentrale" Thiolgruppe wiederum durch einen Maonylrest besetzt, der mit dem Acylrest kondensieren kann: Der zweite Reaktionszyklus beginnt.

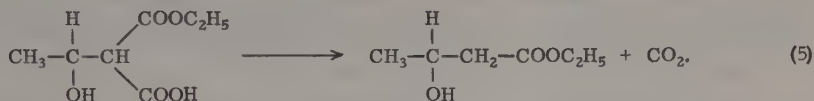
So werden 7 bis 8 Zyklen durchlaufen. Ist Palmityl- oder Stearyl-ACP entstanden, wird die Synthese durch Übertragung auf Coenzym A abgebrochen. Warum der Kettenabbruch auf dieser Stufe erfolgt, konnten SUMPER und OESTERHELT mit Hilfe eines mathematischen Modells beschreiben (21, 22).

Besonderes Interesse galt der eigentlichen kettenverlängernden Reaktion, der Kondensationsreaktion. Sie wurde von LYNEN allgemein als "Kondensation unter Decarboxylierung" erkannt (14). Der genaue Reaktionsmechanismus - zwar oft diskutiert, aber noch nicht experimentell untersucht - blieb unbekannt. Ihn aufzuklären, war Ziel der vorliegenden Arbeit.

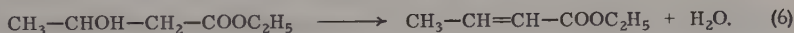
In der organischen Chemie wird seit langem die Reaktionsfähigkeit der Malonsäure, ihrer Halb- und Diester zu Synthesen ausgenutzt. Den klassischen Reaktionen Michael-Addition (1887) und Knoevenagel-Reaktion (1898) sowie der Umsetzung mit Alkylhalogeniden liegt eine wesentliche Eigenschaft der Malonsäure und ihrer Ester zugrunde. Infolge der Nachbargruppen sind die Methylenprotonen "beweglich" (23), allerdings gehen Malonsäure und -ester im Gegensatz zu Acetessigester keine freiwillige Enolisierung ein (24). (Malonester sind selbst in wäßrigem Alkali unlöslich.) Zur Reaktion mit Carbyonylverbindungen sind daher immer Basen, wie Piperidin, β -Alanin oder andere erforderlich. Das Reaktionsprinzip veranschaulichen die Gleichungen 3-6 anhand eines Beispiels nach KNOEVENAGEL-DOEBNER (25):



Das Produkt decarboxyliert leicht unter Bildung des β -Hydroxybuttersäure-esters.

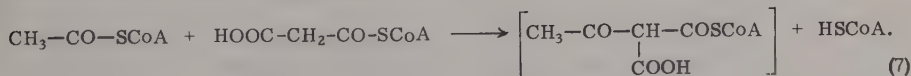


Wird die Decarboxylierung durch Erhitzen der Reaktionsmischung unterstützt, erfolgt gleichzeitig Wasserabspaltung und es wird der Ester der α - β -ungesättigten Carbonsäure, der Crotonsäureester, isoliert:



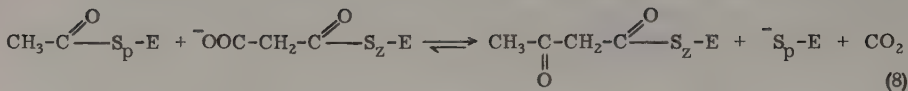
Man erkennt die Ähnlichkeit zu Zwischenstufen der Fettsäurebiosynthese. Den Sauerstoffestern gegenüber sind die Thioester in ihrer Reaktionsfähigkeit überlegen (26). Vergleichende Experimente zeigten, daß Äthylthiomalonat in der piperidin-katalysierten Knoevenagel-Reaktion mit Benzaldehyd viermal schneller als Äthylmalonat reagiert (27).

Es lag daher nahe, die enzymatische Kettenverlängerung bei der Fettsäuresynthese chemisch als "Claisen-Kondensation" von Acetyl- bzw. Acyl-thioester mit dem "Knoevenagel-Reaktionspartner" Malonylthioester, also als eine Kombination der Claisen- und der Knoevenagel-Kondensation, zu klassifizieren, wie es LYNEN (19), VAGELOS (28), WAKIL und GANGULY (29), unternahmen:



Die Hypothese von WAKIL und GANGULY, daß die anschließenden Reaktionen am Acylmalonyl-Rest bis zur Bildung des Alkylmalonyl-Restes erfolgten, widersprachen chemischen Überlegungen (30). Sie konnte von LYNEN (14) und kurz darauf von BRADY (31) widerlegt werden, die zeigten, daß CO_2 schon bei der Bildung des Acetoacetyl-Restes freigesetzt wird. Außerdem war dieser Syntheseweg mit einem α -Carboxycrotonyl-CoA als Zwischenstufe nicht in Einklang zu bringen gewesen mit den klassischen Arbeiten von SONDERHOFF und THOMAS und besonders von RITTENBERG und BLOCH, die beim Einbau von deuteriertem Acetat in Fette bzw. Fettsäuren mehr Deuterium gefunden hatten, als nur von der endständigen Methylgruppe hätte stammen können (1, 2). Ein Deuterium muß jeweils mit der C_2 -Einheit der Malonylgruppe eingebaut worden sein.

Für den Mechanismus der Kettenverlängerung als "Kondensation unter Decarboxylierung" entsprechend Gleichung (8) stellte LYNEN zwei Möglichkeiten zur Diskussion:



Diese Gleichung trägt der späteren Entdeckung Rechnung, daß sowohl der Acetyl- als auch der Malonyl-Rest kovalent am Enzym gebunden miteinander reagieren (19, 32).

1. Wenn auch Acetylmalonyl-Enzym als stabiles Zwischenprodukt ausschied, so ist dennoch ein intermediäres Acylierungsprodukt des Malonyl-thioesters möglich, das unter sofortiger CO_2 -Eliminierung in die Enolform des Acetoacetyl-thioesters übergeht (19):

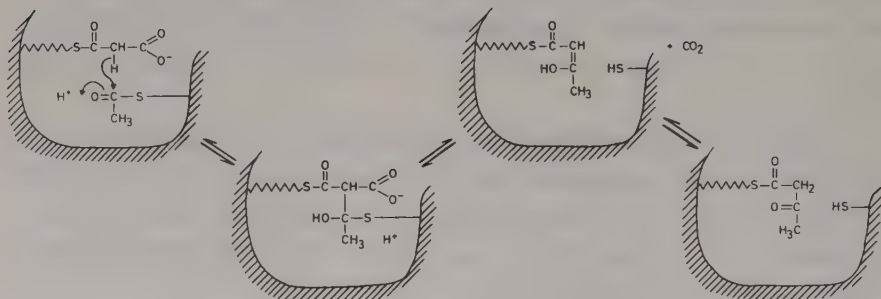


Abb. 2 Mechanismus 1: "Claisen-Typ"-Reaktion

2. Die Alternative ist eine konzertierte Reaktion, bei der Decarboxylierung und Knüpfung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung gleichzeitig, zumindest miteinander gekoppelt, ablaufen (10):



Abb. 3 Mechanismus 2: Konzertierte Reaktion

Vom Reaktionstyp her gesehen, ist die Kondensation eine nucleophile Substitution an der Carbonylgruppe des Acetyl-thioesters. Beide Mechanismen drücken das aus. Der Unterschied besteht lediglich in der Herkunft des Elektronenpaares, das die neue Bindung knüpft. Stammt es von der Bindung eines Protons oder von der Bindung der Carboxylgruppe an das Kohlenstoffatom?

Man kann das Problem auch als Frage nach der mechanistischen Funktion der "CO₂-Aktivierung" der Acetyl-CoA formulieren. Diese Funktion kann sein:

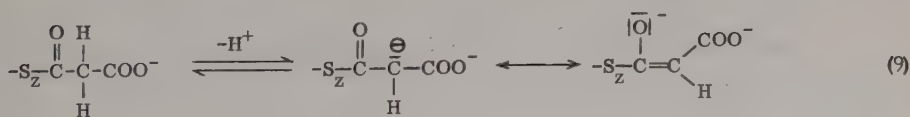
1. Erhöhung der Acidität der C-H-Bindung,
2. Ersatz des Wasserstoffs einer unpolaren C-H-Bindung der Methyl-Gruppe durch CO₂ als leichter austretende Gruppe.

Wie kann man die Alternative Claisen-Reaktion oder konzertierte Reaktion entscheiden?

Zur Beantwortung der Frage bieten sich zwei Wege:

- a) Kinetische Untersuchung mit Deuterium-markiertem Malonyl-Coenzym A (Kapitel I).

Bei Mechanismus 1 müßte der C-C-Knüpfung die Ablösung eines Protons unter Bildung des Carbanions oder des Enolat-Ions vorausgehen:



Die Kondensations-Reaktion ist geschwindigkeitsbestimmend für die Fettsäuresynthese. Wenn die Deprotonierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Kondensation wäre, sollte Ersatz der Methylen-Wasserstoffatome des Malonyl-CoA durch Deuterium einen primären Isotopen-Effekt von etwa 1.4 bewirken (33). Bei der Aldolreaktion ist die Carbanionbildung geschwindigkeitsbestimmend (34). Ein enzymatisches Beispiel der Carbanionbildung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Aldolkondensation ist die von EGGERER untersuchte Malat-Synthese (35). Sollte aber nicht die Ablösung eines Protons geschwindigkeitsbestimmend sein und in einer vorgelagerten Gleichgewichts-Reaktion erfolgen, sondern die Knüpfung der neuen C-C-Bindung die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen, könnte ein inverser sekundärer Isotopeneffekt auftreten. D- und T-markierte Moleküle reagieren allgemein rascher beim Übergang von der sp²- in die

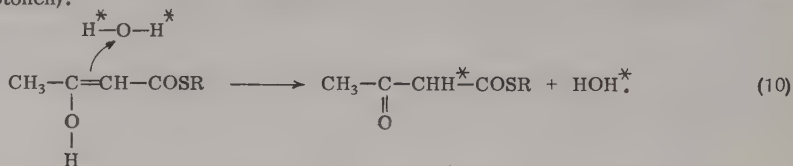
sp³-Konfiguration (36).

Nach Mechanismus 2 (konzertierte Reaktion) erfolgt CO₂-Eliminierung und Knüpfung der C-C-Bindung in einem Reaktionsschritt ohne vorherige Ablösung eines Protons. Im Gegensatz zu Mechanismus 1 wäre hier nur ein geringer sekundärer Isotopeneffekt zu erwarten.

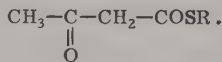
b) Studium des Einbaus von Protonen aus dem Lösungsmittel (Kapitel II).

Eine andere Möglichkeit, zwischen den Mechanismen zu unterscheiden, besteht darin, den Einbau von Protonen aus dem Lösungsmittel zu untersuchen. Dies ist unter Verwendung von tritiiertem Wasser möglich.

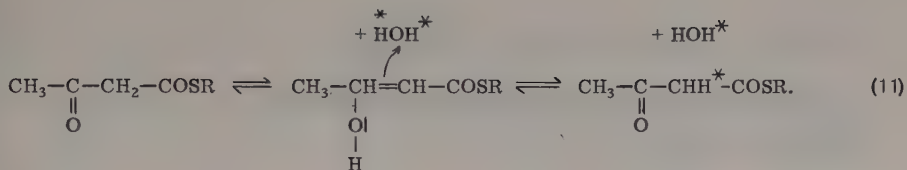
Trifft Mechanismus 1 (Claisen-Kondensation) zu, läuft die Reaktion in mehreren Schritten ab. Durch Decarboxylierung entsteht primär die Enolform des Acetoacetyl-thioesters. Bei der von β-Hydroxybutyryl-Dehydrogenase katalysierten Reduktion von Acetoacetyl-pantethein mit DPNH konnte zwar keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Keto- oder die Enolform reduziert wird (37), es ist jedoch anzunehmen, daß, wie bei Oxalacetat und Pyruvat, die Ketoform reagiert (38, 39). Das Enol des Acetoacetyl-Restes muß sich vor der Reduktion in die Ketoform umlagern. Hierbei wird ein Proton aus dem Lösungsmittel eingebaut (H* sind die mit Tritium markierten Lösungsmittel-Protonen):



Kein Einbau erfolgt jedoch nach dem anderen Mechanismus (konzertierte Reaktion), da die Ketoform direkt entsteht:



Allerdings wird sich der Acetoacetyl-thioester vor der Isolierung mit seiner Enolform ins Gleichgewicht setzen und dabei ebenfalls Protonen aus dem Lösungsmittel aufnehmen:



Gelingt aber rasches Abfangen des Acetoacetyl-Restes durch Überführung in den nicht mehr austauschenden β -Hydroxybutyryl-thioester, kann man zwischen den Mechanismen unterscheiden, wie im folgenden Schema zusammengefaßt ist (Tab. 1):

Einbau von	0	Tritium (pro Molekül)	Konzertierte Reaktion
"	1	"	Claisen-Typ-Reaktion
"	2	"	zu schneller Austausch am Acetoacetyl-Rest; keine Aussage möglich.

B I. Kinetischer Isotopeneffekt bei der Fettsäuresynthese

1. NMR-spektroskopische Untersuchungen und Darstellung von Deutero-malonyl-CoA

Vor der Messung des kinetischen Isotopeneffektes müssen zwei Probleme gelöst werden:
Wie stellt man di-Deutero-malonyl-CoA her?

Ist D-Malonyl-CoA unter den Bedingungen des enzymatischen Testes mit Fettsäuresynthetase stabil genug, so daß tatsächlich deuteriertes Substrat umgesetzt wird?

Daß D-Malonyl-CoA nicht sofort durch Protonenaustausch wieder in H-Mal-CoA übergeht, zeigen die erwähnten in-vivo-Versuche von SONDERHOFF/THOMAS und RITTENBERG/BLOCH (s.S. 5). In-vitro-Experimente mit Taubenleber-Fettsäuresynthetase stammen von BRESSLER und WAKIL (40). Sie stellten T-Mal-CoA durch Carboxylierung von Tritium-Acetyl-CoA her und bauten es in Fettsäuren ein. In der isolierten Palmitinsäure wurden statt der erwarteten 7 Tritium als Mittelwert von 3 Messungen 6.1, bei einer Messung sogar nur 5 gefunden. Die fehlende T-Markierung von 13-29% könnte durch nichtenzymatischen Austausch verlorengegangen sein.

Die Geschwindigkeit des Wasserstoff-Deuterium-Austausches von Malonyl-CoA war noch nicht bekannt. Die Untersuchung des äußerst schnellen Austausches an der Methylengruppe, die sich zwischen Keto- und Thioestergruppe des Acetoacetyl-pantetheins befindet (37) und des relativ langsam austauschenden tertiären Protons von S-Methyl-malonyl-N-succinylcysteamin (41) ließen keinen Schluß für die Verhältnisse beim Malonyl-CoA zu. Als Modellsubstanz für systematische Messungen mit Hilfe der magnetischen Kernresonanz (NMR) diente S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin. Abb. 4 zeigt das NMR-Spektrum der in Hexa-deuteroaceton gelösten Substanz. Dem τ -Wert von 8.1 werden die Methylprotonen der Acetylgruppe zugeordnet.

Der in Richtung niedrigerer τ -Werte liegende Methyl-Gipfel stammt von Spuren Aceton im Lösungsmittel. Den Bereich von 6.9 bis 6.5 τ nehmen Gipfel der Methylenprotonen des Cysteamins ein. Die einsame Spitze daneben bei $\tau = 6.3$ (Gipfel 4) ist das Signal der Methylenprotonen der Malonylgruppe. Es überlagert zwar den äußersten kleinen Gipfel der Cysteamin-Protonen (vgl. Abb. 5e), er ist jedoch so deutlich von der benachbarten Banden-Gruppe entfernt, daß die Kinetik des H-D-Austausches anhand seines Verschwindens in D_2O verfolgt werden kann.

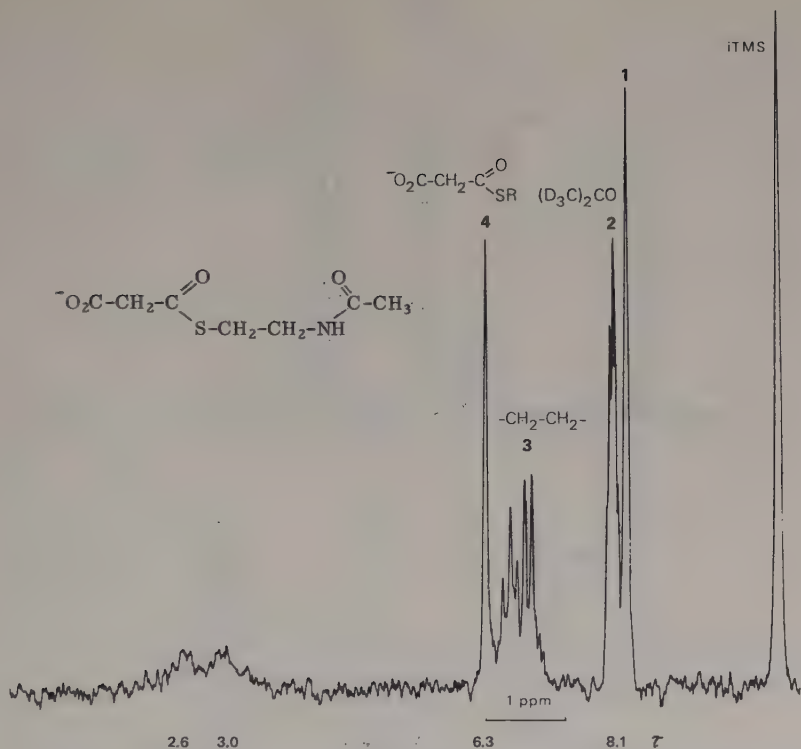
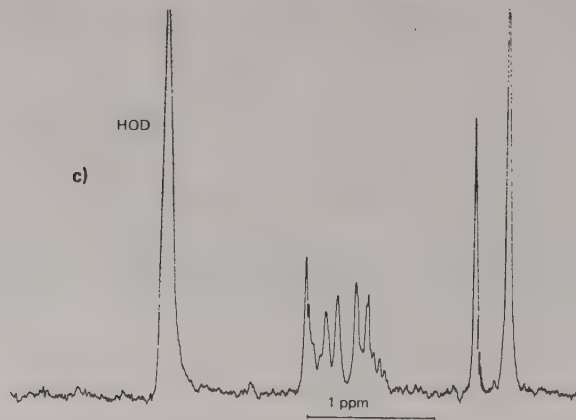
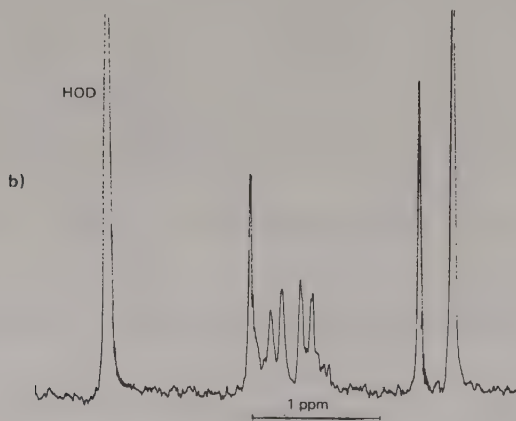
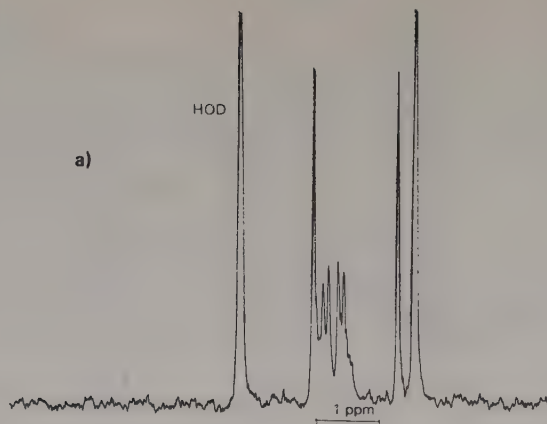


Abb. 4 NMR-Spektrum von S-Malonyl-N-acetylcysteamin in Hexa-deuteroacetone

Abb. 5 demonstriert die sukzessive Abnahme des Gipfels 4 infolge Deuterium-Einbaues. Die Flächenintegrale der schwachen Gipfel bei $\tau = 2.6$ und $\tau = 3.0$ in Abb. 4 entsprechen jeweils einem Proton; es handelt sich um die Protonen der Carboxylgruppe und des Amidstickstoffs.

Zur quantitativen Auswertung des H-D-Austausches dienen die Flächenintegrale des verschwindenden Signals der Methylenprotonen (Gipfel 4). Bezugsgröße war der Gipfel der Methylprotonen (Gipfel 1). Die Zahl der so ermittelten, noch nicht ausgetauschten Protonen wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Der graphischen Darstellung wurde jeweils die Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ entnommen. Ein Beispiel zeigt Abb. 6.



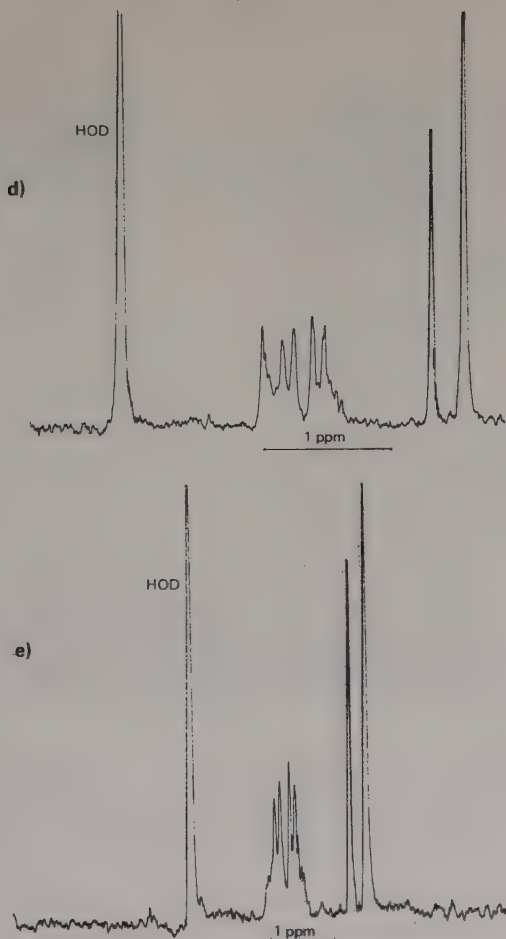


Abb. 5 Veränderung des NMR-Spektrums von S-Malonyl-N-acetylcysteamin mit fortschreitendem Austausch der Methylenprotonen gegen Deuterium.

40 mg wurden in 0.5 ml 0.1 M K_2HPO_4 gelöst, der pH-Wert mit KOH/HCl eingestellt und lyophilisiert. Zum Rückstand wurden 0.5 ml D_2O (25°C, vorthermostatisiert) zugegeben und das NMR-Spektrum bei 25°C aufgenommen. Anschließend erfolgte Messung des genauen pD-Wertes.

a)	Nach	5 Minuten	Austausch
b)	"	10	" "
c)	"	16	" "
d)	"	21	" "
e)	"	200	" "

a)

t [min]	CH ₂ -Signal [Zahl der Restproton.]
8.20	1.52
16.00	0.87
20.50	0.82
25.70	0.64
29.70	0.57
32.80	0.51

b) Abhängigkeit der Zahl der Restprotonen von der Zeit; halblogarithm. Auftragung

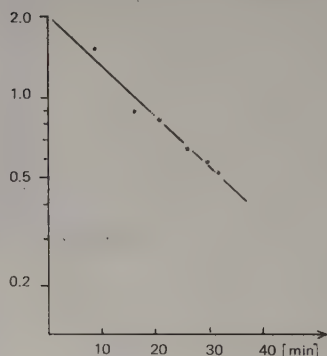
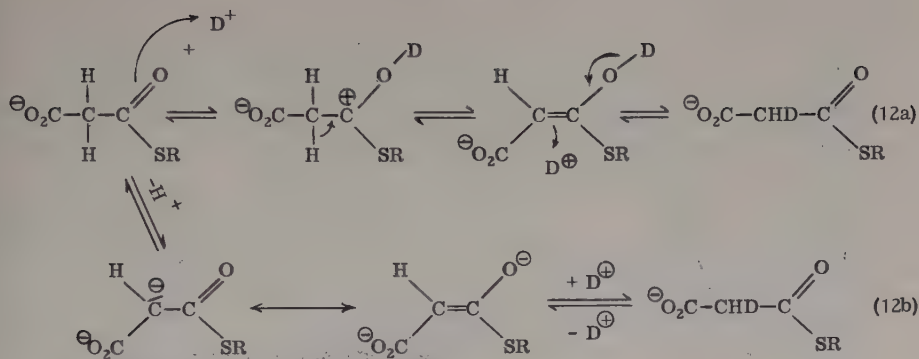


Abb. 6 Fortschreitender Austausch der Malonylprotonen gegen Deuteronen

Auswertungsbeispiel einer Serie von NMR-Messungen, entsprechend der in Abb. 5 dargestellten Spektren. 40 mg S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin in 0.5 ml D₂O (0.4 M), 0.1 M an K₂DPO₄/KOD, pD 7.1, 25°C.

Selbst nach vollständigem Verschwinden der Bande 4 bleibt an seiner Stelle noch ein kleiner Nebengipfel des A₂B₂-Spektrums der Cysteaminprotonen zurück (vgl. Abb. 5 e). Diese Überlagerung fällt aber nur bei niedriger Gipfel-Höhe ins Gewicht; die Kinetik wurde deshalb nicht bis zum Endpunkt verfolgt. Bei den Austausch-Studien wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der später durchgeführten Umsetzung von Malonyl-CoA mit Fettsäuresynthetase gewählt. Der H-D-Austausch ist stark temperaturabhängig. Bei pH 8.2 und 0°C beträgt die Halbwertszeit etwa 3 Stdn., bei 37°C 12 Min. Eine mechanistische Erklärung des D-Einbaus in die Malonyl-Gruppe schließt die Enolform als Zwischenstufe ein, deren Bildung durch Säuren (Gl. 12 a) oder Basen (Gl. 12 b) begünstigt wird. Die Doppelbindung liegt wegen des elektronenziehenden Charakters der Thioestergruppe zwischen den C-Atomen C₁ und C₂:



Die Austauschreaktion muß pH- bzw. pD-abhängig sein*. Ihre Halbwertszeiten bei verschiedenen pD-Werten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2 Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen pD-Werten im Bereich pD 5-9
(Messung s. Legende zu Abb. 5)

pD	5.05	5.63	5.75	6.1	6.5	7.1	7.7	8.9
$\tau_{1/2}$ [min]	1.8	4.8	5.8	10.3	11	16	21	33.5
$k_{\text{beob.}} \cdot 10^{-2}$ [l/Mol · min]	38.5	14.4	11.95	6.73	6.3	4.33	3.3	2.07

Unterhalb von pD 5 kann wegen des schnellen Austausches nicht mehr gemessen werden und oberhalb pD 9 nicht, weil das Malonyl-Protonensignal so stark von dem A_2B_2 -Spektrum überlagert wird, daß die Integrale nicht mehr voneinander getrennt werden.

* Da sie in D_2O abläuft, wurden die pD- und nicht die pH-Werte angegeben. Man erhält sie annähernd durch Addition von 0.4 zu dem am pH-Meter abgelesenen Wert (42).

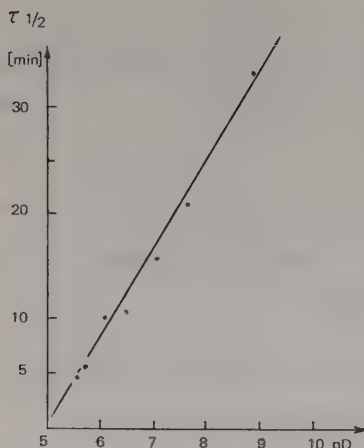
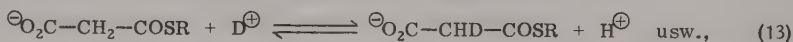


Abb. 7 Halbwertszeiten $\tau_{1/2}$
in Abhängigkeit vom pD-Wert

Die graphische Darstellung der Halbwertszeit in Abhängigkeit vom pD-Wert (Abb. 7) veranschaulicht, daß in dem gemessenen Bereich der Austausch säurekatalysiert ist. Er läßt sich als bimolekulare Reaktion formulieren:



sie läuft in D_2O bei konstantem pD nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudoerster Ordnung ab. Die halblogarithmische Auftragung der Anzahl der Restprotonen über der Austauschzeit (Abb. 6 b) ergibt eine Gerade. Für die dazugehörige Geschwindigkeitskonstante k wird nach

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kt$$

mit Hilfe der Definition der Halbwertszeit $\tau_{1/2}$

$$\ln 1/2 = -k \cdot (\tau_{1/2})$$

die Beziehung

$$k = -\frac{\ln 2}{\tau_{1/2}}$$

abgeleitet, die zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten diene (Tab. 2). Deren halblogarithmische Auftragung gegen den pD-Wert in Abb. 8 ergibt im Bereich pD 9-6 eine Gerade mit der Steigung -1.0.

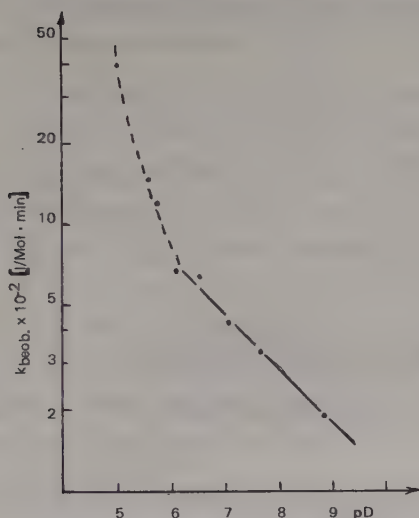


Abb. 8 Halbwertszeit des Deuteriumaustausches an S-Malonyl-N-acetylcystein als Funktion des pD-Wertes.

Die kinetische Gleichung der pseudo-monomolekularen Reaktion lautet:

$$\frac{-d [\text{O}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{COSR}]}{dt} = k_{\text{beob.}} [\text{O}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{COSR}]. \quad (14)$$

$k_{\text{beob.}}$ ist die Geschwindigkeitskonstante bei dem jeweiligen pD-Wert (Tab. 2), enthält also die Abhängigkeit von der D-Ionenkonzentration:

$$k_{\text{beob.}} = k_{\text{D}^+} [\text{D}_3\text{O}^+], \quad (15)$$

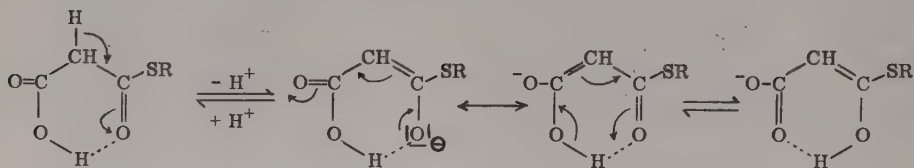
wobei k_{D^+} die eigentliche Geschwindigkeitskonstante der D^+ -katalysierten Reaktion ist. Logarithmierung ergibt:

$$\log k_{\text{beob.}} = \log k_{\text{D}^+} + \log [\text{D}_3\text{O}^+], \quad (16)$$

$$\text{oder } \log k_{\text{beob.}} = \log k_{\text{D}^+} - \text{pD}. \quad (17)$$

Die lineare Funktion $\log k_{\text{beob.}}$ von pD hat das Steigungsmaß -1. Die Übereinstimmung mit der gefundenen Steigung bedeutet, daß die Reaktion im Bereich von pD 6-9 als Säurekatalyse hinreichend genau beschrieben ist und keine zusätzliche Basenkatalyse stattfindet. Die größere negative Steigung unterhalb pD 6 deutet auf einen komplexen Mechanismus hin.

In saurer Lösung wird die Enolisierung durch Ausbildung eines cyclischen Übergangszustandes mit zusätzlicher Tautomerie- und Mesomeriemöglichkeit energetisch erleichtert (Abb. 9) *:



2. Darstellung und Stabilität von di-Deutero-malonyl-Coenzym A

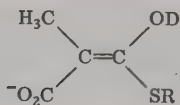
Abb. 7 beantwortet die Frage nach a) Darstellung und b) Stabilität von 2-di-Deutero-malonyl-CoA (vgl. S. 10):

a) Es kann durch Isotopenaustausch des wasserfreien H-Mal-CoA in D_2O bei einem pD-Wert von 3 bis 5 hergestellt werden. D-Mal-CoA wird in der zum Austausch verwendeten Lösung aufbewahrt. Es behält dadurch die gleiche Markierung bei, im Gegensatz zu der von BRESSLER (40) beschriebenen Darstellungsmethode der Carboxylierung von T-Acetyl-CoA.

b) Für Einbauversuche in Isotopen-markiertem Wasser kann die Stabilität von H-Mal-CoA gegenüber dem nicht-enzymatischen Isotopeneinbau direkt aus Abb. 7 entnommen werden. Im Bereich des pH- bzw. pD-Maximums der Fettsäuresynthetase (s. Abb. 10) von pH 6 bis 7 steigt die Halbwertszeit des "Blindeinbaues" von 8.5 auf 17 Min. **. Es empfiehlt sich, bei einem pH-Wert von 6.5 ($\tau_{1/2} = 12.5$ Min.) bis 7.0 ($\tau_{1/2} = 17$ Min.) zu arbeiten. Noch günstiger hinsichtlich der Stabilität ist pH 7.5, allerdings erreicht hier die Enzymaktivität nicht mehr den maximalen Wert.

* pK-Wert und weitere Erklärung s. exp. Teil C 5b.

** Im Vergleich dazu beträgt nach Messungen von OVERATH et al. die Halbwertszeit bei S-Methylmalonyl-N-succinyl-cysteamin bei pH 7.1 480 Min. (41). Hier ist die Bildung der Enolform, die nach Gleichung (12a) Voraussetzung für den Austausch ist, durch die Methylgruppe sterisch behindert.



Der umgekehrte Austausch, der am Deuterium-malonyl-Derivat in wäßrigem Milieu stattfindet, läßt sich nicht NMR-spektroskopisch messen. H₂O als Lösungsmittel überdeckt den ganzen Spektrenbereich. Er läßt sich aber abschätzen.

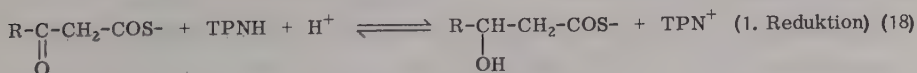
Die Geschwindigkeit der Enolisierung ist um Größenordnungen kleiner als die der Ketonisierung (43), daher bestimmt die Enolisierung die Geschwindigkeit des Isotopenaustausches. Im Fall des D-Mal-CoA wird bei der Enolisierung eine D-C-Bindung getrennt und ein Deuteron eliminiert. Der zu erwartende Isotopeneffekt wurde von K.B. WIBERG an der Enolisierung des Hexa-deutero-acetons gemessen (44). Er beträgt 6 bis 7. Der Isotopeneffekt muß in unserem Beispiel nicht 6-7 betragen, ist aber wahrscheinlich größer als 1. Für den D-H-Austausch von di-Deutero-malonyl-thioester ist daher zwischen pH 6.5 und 7.5 mit Halbwertszeiten von länger als 12.5 bis 21 Min. zu rechnen. Diese Stabilität erlaubt es, enzymatische Versuche, bis zu einer Dauer von 2 Min. durchzuführen. Während dieser Zeit werden höchstens 10% bis 6% der Protonen nicht-enzymatisch ausgetauscht.

Das Ergebnis $\tau_{1/2} > 7$ Min. bei pH 7.0 gilt ebenso für enzymatische Versuche mit tritiiertem Malonylthioester. Da der Isotopeneffekt von Tritium größer als der von Deuterium ist, ist hier mit noch längeren Halbwertszeiten als beim Deutero-malonyl-Derivat zu rechnen.

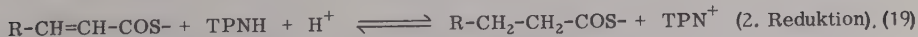
3. Enzymatische Untersuchungen mit D-Malonyl-CoA

a) D-Malonyl-CoA im Standard-Test der Fettsäure-Synthetase aus Hefe

di-Deutero-malonyl-CoA wurde im optischen Test zur Bestimmung der Fettsäuresynthetase-Aktivität eingesetzt. Während eines Reaktionszyklus der Fettsäuresynthese werden entsprechend Abb. 1 (S. 3) 2 μ Mol TPNH pro μ Mol Malonyl-CoA benötigt, nämlich zur Reduktion des β -Ketoacyl-Restes



und zur Hydrierung des α - β -ungesättigten Acyl-Restes



Die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese kann also am TPNH-Verbrauch gemessen werden. Hierbei wird die zeitliche Abnahme der TPNH-Extinktion photometrisch verfolgt.

Tabelle 3 Messung des Isotopeneffektes bei Einsatz von D-Mal-CoA im optischen Test zur Bestimmung der Aktivität von Fettsäuresynthetase aus Hefe

Test-Nr.	$\Delta E [x 10^{-3}]$ pro 4 Min.	Enzymaktivität [mE/mg]	
		H-Mal CoA	D-Mal CoA
1	157	2 590	
2	160	2 630	
3	167	2 750	
4	168	2 760	
5	177		2 910
6	178	2 930	
7	175		2 880
8	168	2 760	
9	166		2 730
10	166	2 730	
11	165		2 710
12	167	2 750	
13	158		2 600
14	167	2 750	
15	172		2 830
16	158		2 600
17	160	2 630	
Mittelwerte: 166		<u>2 730</u>	<u>2 750</u>

Optischer Test bei 334 m μ und 25°. Die Testküvette enthielt im Volumen von 1 ml: 100 μ Mol K-Phosphat-Puffer pH 6,5, 0,3 mg Serumalbumin, 10 μ Mol Cystein, 0,24 μ Mol Acetyl-CoA, 0,2 μ Mol TPNH und 2,5 γ Fettsäuresynthetase. Nach 2,5 Minuten Vorinkubation und Beobachtung des Blindlaufes wurde mit 0,07 μ Mol Malonyl-CoA gestartet.

In Tab. 3 sind die Werte einer Meßserie zusammengefaßt, bei der die Synthese abwechselnd durch Zusatz von H-Mal-CoA oder von D-Mal-CoA gestartet wurde. Für die Auswertung wurde die Extinktionsabnahme während der ersten Minute herangezogen. Die Geschwindigkeiten der Extinktionsabnahme sind auf Enzymaktivitäten umgerechnet ($1 \text{ mE} = 1 \text{ m}\mu\text{Mol Mal-CoA-Einbau}$ unter Testbedingungen, wie in Tab. 3 angegeben).

Die Ergebnisse weichen nur um etwa 0,7% voneinander ab, die relativen Fehler der Mittelwerte betragen bei H-Mal-CoA 1,5% und bei D-Mal-CoA 1,7%. Die Abweichung von 0,7% liegt also innerhalb der Fehlergrenze für die Einzelmessungen. Daraus folgt eindeutig: Bei pH 7,5 liegt kein primärer Isotopeneffekt vor.

b) pH-Abhängigkeit der Fettsäuresynthese-Geschwindigkeit bei Einsatz von D-Malonyl-CoA und Lösungsmittelisotopeneffekt in Deuteriumoxid

Um die Aussage des vorhergehenden Abschnittes abzusichern, ist die Messung der FSS-Aktivität mit H- und D-Mal-CoA über einen größeren pH-Bereich erforderlich (45). Es wurden Puffer gewählt, die sich in ihrem pH-Bereich überlappen. Tab. 4 und Abb. 10 zeigen das Ergebnis. (Die pH-Abhängigkeit mit H-Mal-CoA wurde zuerst von LYNEN, HOPPER-KESSEL und EGGERER gemessen (14), hier aber aus Vergleichsgründen wiederholt.)

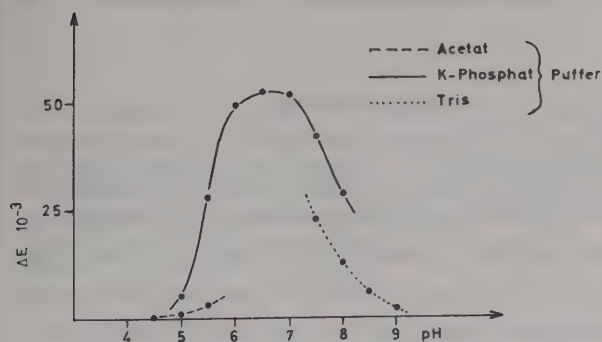


Abb. 10 pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese in verschiedenen 0,1 M Puffern (Ausführung s. Tab. 4)

Parallel zu diesen Messungen wurden entsprechende Aktivitätsbestimmungen in D_2O durchgeführt (Tab. 4 und Abb. 11):

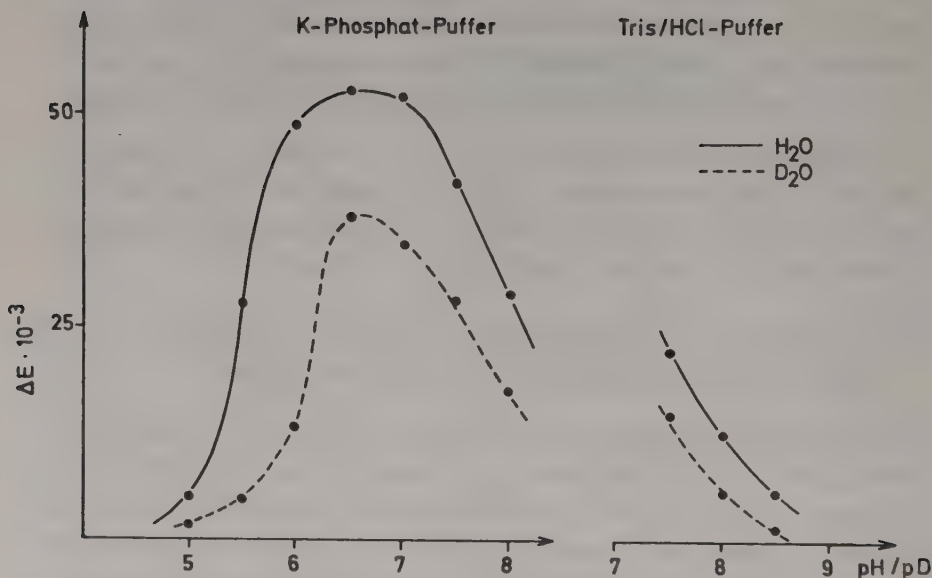


Abb. 11 Lösungsmittel-Isotopeneffekt in Deuteriumoxid und dessen pH-/pD-Abhängigkeit in 0.1 M Kalium-Phosphat- und 0.1 M Tris/HCl-Puffer (Ausführung s. Tab. 4). Da die Reaktionsgeschwindigkeiten für H- und D-Mal-CoA nahezu identisch sind (Tab.4), wurden, ebenso wie in Abb. 10, deren Mittelwerte aufgetragen.

Der Tabelle 4 und den Abbildungen 10 und 11 läßt sich entnehmen:

1. Die Aktivitäten bei demselben pH-Wert aber verschiedenem Puffer sind nicht gleich, die pH-Abhängigkeitskurven überlappen sich nicht. Es liegt eine Salzaktivierung der Fettsäuresynthetase durch Kaliumphosphat vor. Da die Kondensation die Geschwindigkeit der Synthese bestimmt, kann man eine Analogie in der Kaliumphosphat-Aktivierung des kondensierenden Teilenzym aus *E.coli* sehen. PRESCOTT vermutet als dessen Ursache eine Konformationsänderung des Enzyms (46). Bei höheren Phosphat-Konzentrationen dagegen sinkt die Aktivität der Fettsäuresynthetase aus Hefe (47).
2. In D_2O beobachtet man ebenfalls eine Aktivierung durch Kaliumphosphat.
3. Deuteriumoxid bewirkt einen Lösungsmittel-Isotopeneffekt; die pH-/pD-Abhängigkeitskurven verlaufen annähernd parallel zueinander. Die Interpretation von Lösungsmittel-Isotopeneffekten ist bereits bei einfachen enzymatischen Reaktionen nicht leicht (48), bei der Behandlung eines Multienzym-Komplexes erscheint dies aussichtslos.

Tabelle 4 pH-Abhängigkeit der Fettsäuresynthese-Geschwindigkeit bei Einsatz von H- und D-Malonyl-CoA in H₂O und D₂O (optischer Test bei 334 mμ wie in Abschnitt 3a beschrieben)

Puffer	pH-/pD-Wert	$\Delta E \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$			
		H ₂ O		D ₂ O	
		H-Mal-CoA	D-Mal-CoA	H-Mal-CoA	D-Mal-CoA
Acetat	4.5	0	0	0	0
"	5.0	0,5	0	0	0
KPO ₄	5.0	5,2	5,0	1,9	1,7
Acetat	5,5	2,7	2,6	1,1	/
KPO ₄	5,5	28,1	27,3	13,3	/
"	6,0	49,8	47,8	18,8	/
"	6,5	52,3	53,3	39,3	37,0
"	7,0	52,8	51,8	32,8	34,8
"	7,5	42,5	41,8	29,0	28,3
Tris/HCl	7,5	23,3	22,0	14,8	14,0
KPO ₄	8,0	29,8	28,5	17,8	18,0
Tris/HCl	8,0	12,8	12,5	5,8	/
"	8,5	6,0	6,0	1,8	/
"	9,0	2,3	2,0	/	/

Ein Volumen von 1 ml enthält: 100 μMol des angegebenen Puffers, 0,4 mg Rinderserumalbumin, 10 μMol Cystein, 0,18 μMol Acetyl-CoA, 0,2 μMol TPNH und 2,65 γ Fettsäuresynthetase aus Hefe (spez. Aktivität 1700 mE/mg). Nach 2,5 Min. Vorinkubation bei 25° und Beobachtung des Blindlaufes wurde mit 0,07 μMol H- oder D-Mal-CoA, wie angegeben, gestartet. Die D₂O-haltige Lösung war 82% an Deuteriumoxid. Wegen der erwarteten rein qualitativen Aussage wurde darauf verzichtet, in 100proz. D₂O zu messen.

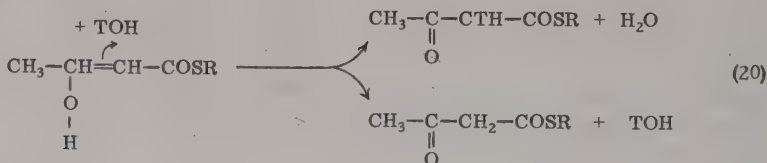
Der Befund wird daher nicht diskutiert.

4. Im gesamten pH-Bereich, in dem die Fettsäuresynthetase aktiv ist, tritt bei der Umsetzung von D-Mal-CoA statt H-Mal-CoA kein primärer Isotopeneffekt auf. Das ist sowohl in der Versuchsgruppe mit H₂O als auch in der mit D₂O als Lösungsmittel der Fall.

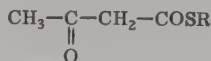
Die Abwesenheit eines Isotopeneffektes schließt allgemein eine Übertragung von Wasserstoff nicht aus (48). Da nur das Auftreten eines Isotopeneffektes in unserem Fall eindeutig hätte interpretiert werden können, besitzt das Ergebnis keine Beweiskraft. Es ist aber ein Hinweis auf das Vorliegen eines konzertierten Mechanismus.

B II. Studium des Einbaus von Protonen aus dem Lösungsmittel

Die kinetischen Untersuchungen basieren auf der Möglichkeit, daß ein Wasserstoff- oder Deuterium-Ion aus dem Substrat Malonyl-CoA entfernt wird. Wie bereits früher erwähnt wurde (S. 8), kann man unabhängig davon zwischen den Mechanismen unterscheiden, indem man untersucht, ob ein Proton aus dem tritiumhaltigen Lösungsmittel eingebaut wird. Bei der "Claisen-Typ"-Reaktion entsteht primär die Enolform des Acetoacetyl-thioesters, die bei der Umlagerung in die Ketoform ein Proton aus dem Lösungsmittel aufnimmt:



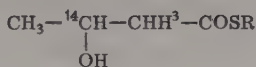
Bei der konzertierten Reaktion dagegen enthält die direkt entstehende Ketoform kein Proton aus dem Lösungsmittel (s. S. 6 und Abb. 2 und 3):



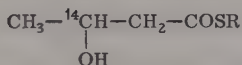
Um zu verhindern, daß die Ketoform des Acetoacetyl-thioesters Protonen mit dem Lösungsmittel austauscht, soll sie durch Reduktion mit Kaliumborhydrid abgefangen werden. Es entsteht β -Hydroxybutyryl-thioester:



Der β -Hydroxybutyryl-Rest wird durch Einbau von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA mit Kohlenstoff-14 markiert. Diese Markierung erscheint am C-Atom 3 und dient als Bezugsgröße für inkorporierte Tritium-Aktivität. Je nach Mechanismus wird in einem Fall



und im anderen



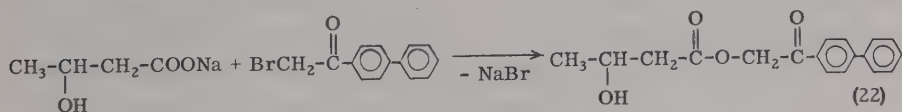
entstehen.

1. Isolierung von β -Hydroxybuttersäure

Zur Bestimmung der Kohlenstoff-14 und Tritium-Aktivität muß die enzymgebundene β -Hydroxybuttersäure isoliert werden. Die Abtrennung von der "Acyl-Carrier-Protein"-Einheit geschieht durch einfache Verseifung des alkaliempfindlichen Thioesters (14). Diffiziler ist die Reinigung von den anderen radioaktiven Substanzen.

a) Isolierung als kristallisierbares Derivat

β -Hydroxybuttersäure kann durch Überführung in ein Derivat gereinigt werden, das bis zur konstanten Radioaktivität umkristallisiert wird. I. HOPPER-KESSEL benutzte das Hydrazid (49). Die Ausbeute nach dreimaligem Umkristallisieren betrug jedoch nur 30%. Nach einem anderen Bericht war sie noch geringer (50). Um im Fall eines Tritium-Einbaus in einen günstigen Meßbereich zu gelangen, müßten im Inkubationsansatz bei der hohen Enzymkonzentration von 20 mg Fettsäure-Synthetase pro ml immerhin 4 Curie Tritiumwasser eingesetzt werden. Das Kontingent unseres Institutes war auf 2 Curie-Einheiten beschränkt. Es wurde daher ein β -Hydroxybuttersäure-Derivat gesucht, das weniger verlustreich durch Umkristallisieren zu reinigen ist. Umsetzung mit ω -Brom-4-phenyl-acetophenon zu β -Hydroxybutyryl-p-phenyl-phenacylester schien geeignet zu sein:



Dreimaliges Umkristallisieren führte mit einer Ausbeute von 55% zur 98,9proz. Abtrennung von vorher zugesetztem $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-4-phenyl-phenacylester, der bei der Aufarbeitung einer $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA enthaltenden Inkubationsmischung entstehen würde.

Überraschenderweise gelang mit dieser Methode jedoch nicht die Abtrennung von ^{14}C -Essigsäure.

Da die ^{14}C -Radioaktivität nicht von dem leicht abtrennbaren ^{14}C -Acetyl-4-phenylphenacyl-ester stammen konnte, mußte während der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes (Ansäuern mit Schwefelsäure, Zusatz von Natriumsulfat, Ätherextraktion des trockenen Rückstandes) eine partielle Acetylierung der 3-Hydroxygruppe der β -Hydroxybuttersäure erfolgt sein ^{*}. Das Derivat von 3-O-Acetyl- β -oxybuttersäure ist von dem der β -Hydroxybuttersäure nicht abtrennbar. Es mußte somit ein besseres Verfahren zur Isolierung von β -Hydroxybuttersäure gefunden werden.

b) Gaschromatographische Reinigung

Andere Trennungsmethoden, wie Celite-Säulenchromatographie nach REGEN (52) und Chromatographie mit Hilfe von Anionenaustauschern nach BUSH (53) kamen wegen des dabei benutzten sauren Milieus (0.4 N H_2SO_4 oder 0.1 - 6 N HCOOH) nicht in Frage; es bestand die gleiche Gefahr der 3-O-Acylierung der β -Hydroxybuttersäure mit ^{14}C -Essigsäure.

Ein brauchbares Verfahren bot sich mit der Gaschromatographie an, zumal bei nachgeschaltetem Verbrennungsofen und Durchfluß-Szintillationszähler (54) die Reinigung der β -Hydroxybuttersäure mit deren Radioaktivitätsbestimmung verbunden werden konnte.

Die gaschromatographische Trennung von Wasser und freien Säuren wurde mit Erfolg auf der unpolaren Phase "Porapak Q" durchgeführt (55). Um im Fall der β -Hydroxybuttersäure eine praktikable Retentionszeit zu erzielen, mußte bei 200°C ($T_{\text{Ret.}} = 28 \text{ min}$) gearbeitet werden. Dabei erschienen jedoch zwei Gipfel, von denen der eine Crotonsäure zugeordnet werden konnte; β -Hydroxybuttersäure wurde also teilweise dehydratisiert. Es war deshalb wünschenswert, β -Hydroxybuttersäure in ein leichterflüchtiges, stabiles Derivat überzuführen. Dafür kam das trimethylsilylierte Produkt in Betracht. Von den Silylierungsagenzien N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid in Essigester, Bis-trimethylsilylacetamid in Essigester und einer Mischung von Trimethylchlorsilan, Hexamethyldisilazan und Bis-trimethylsilylacetamid in Pyridin erwies sich letztere als

* Das konnte radiogaschromatographisch bestätigt werden durch Zuordnung eines radioaktiven Gipfels zu 3-O-Acetyl- β -oxybuttersäure, die nach (51) syntetisiert wurde.

am besten geeignet, vor allem auch hinsichtlich der Erkennung und Abtrennung von Crotonsäure, die sich aus β -Hydroxybuttersäure bzw. seinem Thioester im Verlauf der Aufarbeitung bilden könnte (56). β -Hydroxybuttersäure wurde in 3-O-Trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure-trimethylsylester, kurz Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure genannt, überführt.

Im Gaschromatogramm einer Mischung der trimethylsilylierten Essigsäure, Malonsäure, Crotonsäure und β -Hydroxybuttersäure sind, wie Abb. 12 und 13 zeigen, außer dem Gipfel des Lösungsmittels und der Silylierungsagenzien nur noch drei weitere Gipfel zu sehen. Auf einer mit NPGS beladenen Säule ist die Reihenfolge: Crotonsäure (Gipfel a), β -Hydroxybuttersäure (Gipfel b), Acetamid (Gipfel c); auf der Dinonylphthalat-Säule jedoch Crotonsäure, Acetamid, β -Hydroxybuttersäure, wie sich unter Einsatz der authentischen Verbindungen zeigen ließ. Essigsäure und Malonsäure, die wegen ihrer radioaktiven Markierung (^{14}C -Acetyl- und T-Malonyl-) das Versuchsergebnis verfälschen könnten, verließen die Säule zusammen mit dem Lösungsmittel und wurden somit vollständig abgetrennt.

Um die Identität der Gipfel a und b mit den Trimethylsilyl-Derivaten der Crotonsäure und β -Hydroxybuttersäure zu beweisen, wurden diese Substanzen nach (57) präparativ dargestellt. Da Mikrodestillation unter vermindertem Druck noch nicht zu den reinen Substanzen führte, wurden sie gaschromatographisch nachgereinigt und in einem gewinkelten, am Detektorausgang angebrachten Rohr unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit aufgefangen. Die Retentionszeiten der aufgefangenen Hauptgipfel waren bei den synthetischen Produkten die gleichen wie diejenigen der Gipfel a und b. Die Elementaranalyse der Substanz aus Gipfel a stimmt mit den für Crotonsäure-trimethylsylester berechneten Werten, die aus Gipfel b mit denjenigen für Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure überein.

Einen weiteren Identitätsbeweis lieferten die NMR-Spektren (Abb. 14 bis 17), von denen sich die der Trimethylsilyl-Derivate gegenüber denen der in D_2O gelösten Säuren lediglich durch zusätzliche Gipfel unterschieden, die aufgrund der Integrale und der chemischen Verschiebungen den Protonen von Trimethylsilylgruppen zuzuordnen waren. Die τ -Werte der chemischen Verschiebungen sind in Tab. 5 und 6 wiedergegeben. Der Unterschied der chemischen Verschiebungen der Bande A in Tab. 6 läßt sich durch den Einfluß der raumfüllenden Trimethylsilyl-Gruppe auf das cis-ständige Proton des Crotonsäure-Derivates erklären.

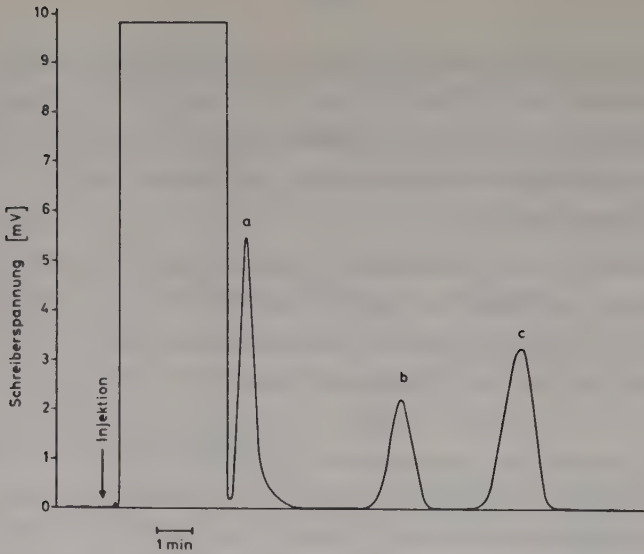


Abb. 12 Gaschromatographische Trennung von β -Hydroxybuttersäure — NPGS-Säule
Säulenfüllung Chromosorb/NPGS 20 %; Säulenlänge 1.5 m; Temp. 110°;
Strömungsgeschwindigkeit 25 ml/min.
a α -Crotonsäure-trimethylsilylester; b Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure;
c Trimethyl-silylacetamid.

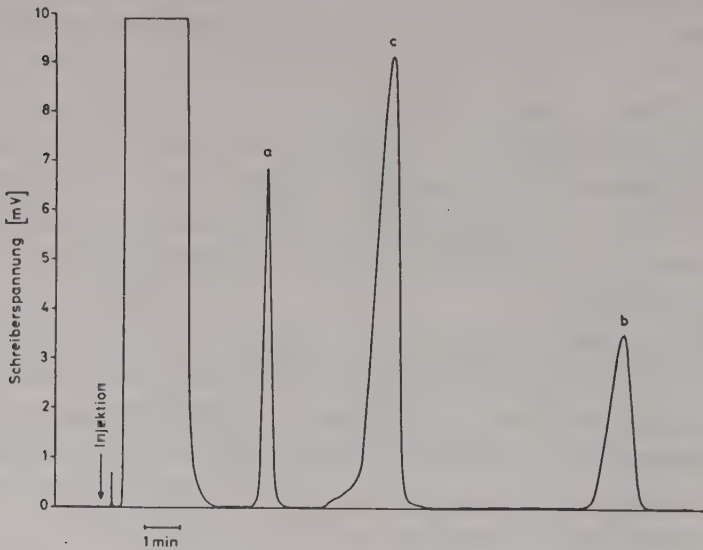


Abb. 13 Gaschromatographische Analyse von β -Hydroxybuttersäure
Dinonylphthalatsäule: 2 m; 125°; 25 ml/min; Zuordnung der Gipfel siehe Abb. 12.

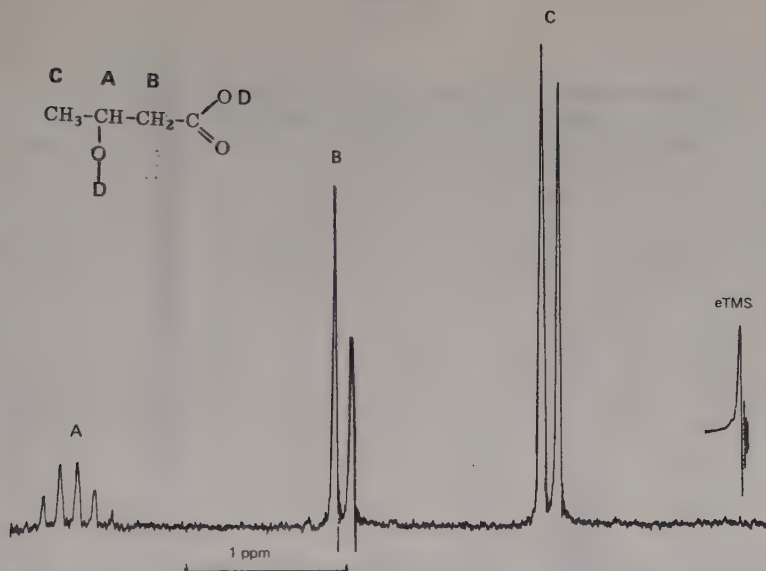


Abb. 14 NMR-Spektrum von β -Hydroxy-buttersäure in Deuteriumoxid

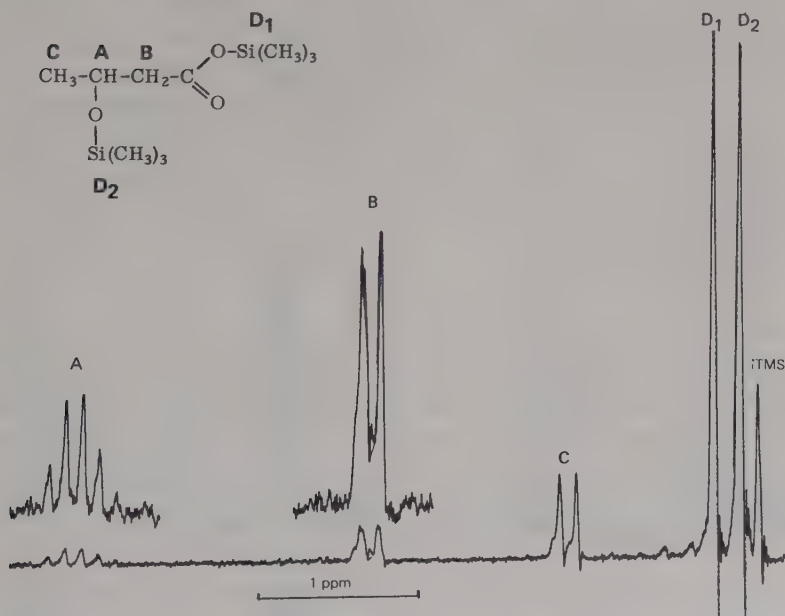


Abb. 15 NMR-Spektrum von Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure in Deuteriochloroform

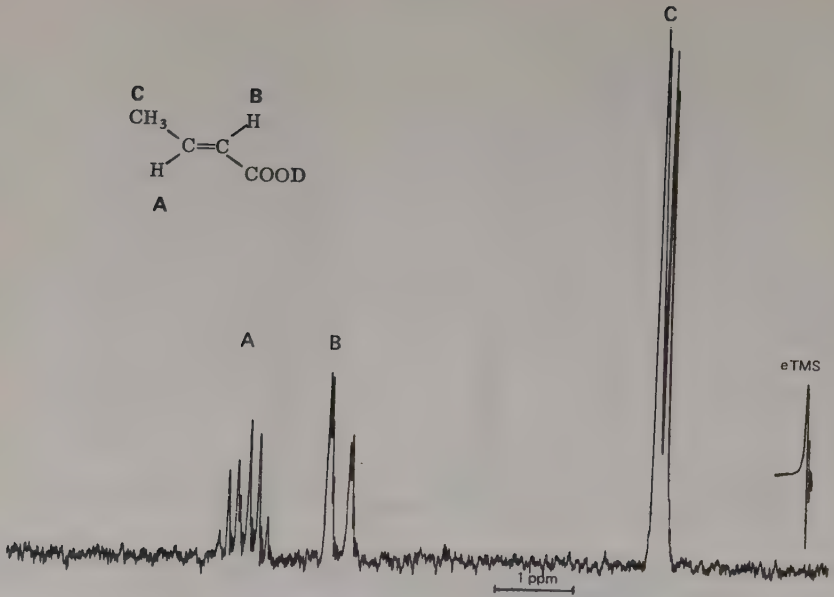


Abb. 16 NMR-Spektrum von α -Crotonsäure in Deuteriumoxid

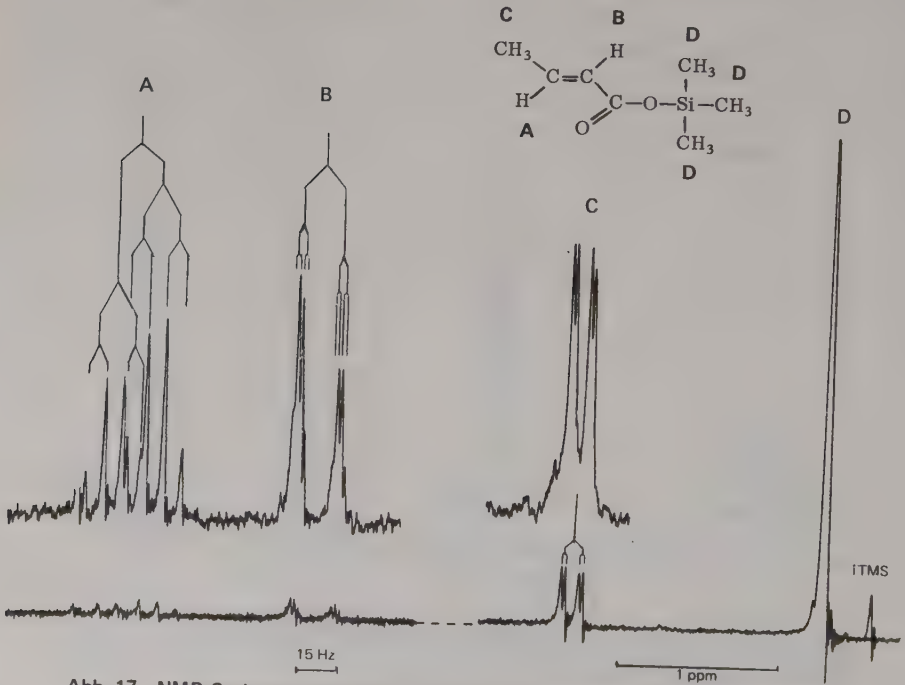


Abb. 17 NMR-Spektrum von α -Crotonsäuretrimethylsilylester in Deuteriochloroform

Tabelle 5 Chemische Verschiebungen von β -Hydroxybuttersäure und seinem Bis-trimethylsilyl-Derivat

Signal	A	B	C	D ₁	D ₂
Protonen	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$	>CH_2	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \end{array}$	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$	$\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
di-D- β -OH-B.S. in D ₂ O	5.73	7.58	8.81	—	—
Bis-TMS- β -OH-B.S.	5.73	7.58	8.80	9.73	9.91

Tabelle 6 Chemische Verschiebungen von Crotonsäure und ihres Trimethylsilylesters

Signal	A	B	C	D
Protonen	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{H}-\text{C}=\text{C} \\ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{C}=\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{C}=\text{C} \\ \end{array}$	$-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
Croton-S. (in D ₂ O)	2.87	4.17	8.10	—
Croton-S.- -TMS	3.02	4.18	8.12	9.69

Zur Messung der Isotopenmarkierung wurden die gaschromatographierten Substanzen in einem dem Gaschromatographen nachgeschalteten Verbrennungssofen über Kupferoxid zu $^{14}\text{CO}_2$ und H_2O verbrannt und anschließend durch eine Szintillationszelle geleitet. Sollte bei doppelmarkierter Substanz Tritium gemessen werden, wurde der Gasstrom außerdem über Stahlwolle geleitet (113), wie in Abb. 18 schematisch dargestellt ist.

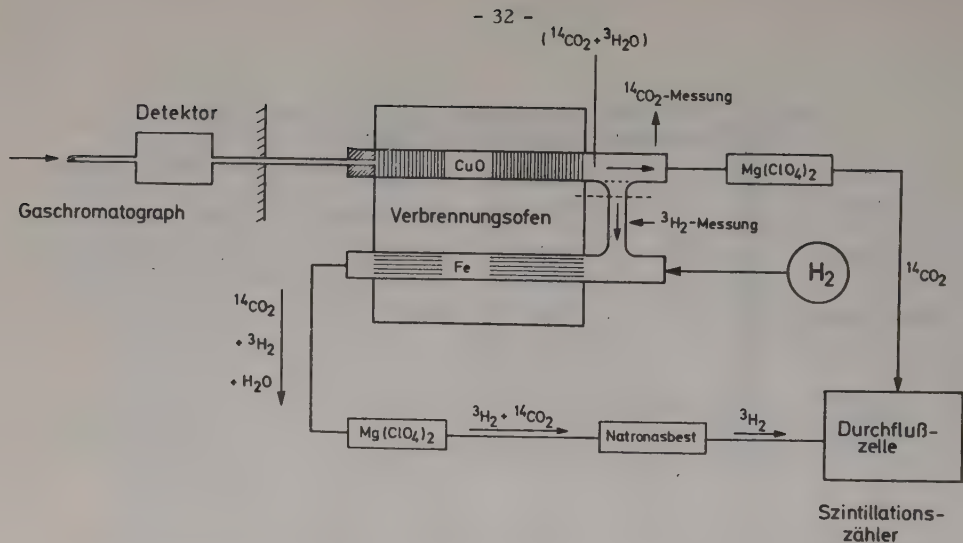
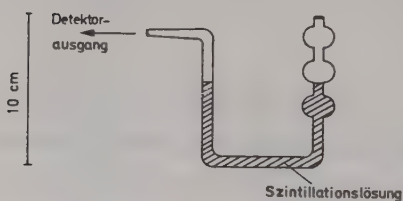


Abb. 18 Schematische Darstellung der Radiogaschromatographie von ^3H -/ ^{14}C -isotopenmarkierten Verbindungen. Durch Auswechseln des CuO -gefüllten Rohres gegen das mit CuO und Stahlwolle gefüllten Doppelrohres kann von ^{14}C -Messung auf ^3H -Messung übergegangen werden.

Die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler mit Durchflußzelle bestimmt; Allerdings konnte wegen zu niedriger Zählrate vor allem des ^3H (s. exp. Teil) diese Methode nur zur qualitativen Analyse der Produktzusammensetzung benutzt werden (Abb. 19, S. 34), nicht aber zur Registrierung der erwarteten schwachen ^3H -Markierung von β -Hydroxybuttersäure. Das wurde erst mit folgendem Verfahren möglich:



Die Substanz wird am Ausgang des Gaschromatographen in einem mit Szintillationsmedium gefüllten, in nebenstehender Abbildung dargestellten Siphonröhrchen aufgefangen und ihre Isotopenmarkierung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.

Diese Methode zeichnet sich gegenüber der eigentlichen Radiogaschromatographie, bei der Gaschromatograph, Verbrennungsofen und Szintillationszähler in Reihe geschaltet sind, durch folgende Vorteile aus:

- a) Die Zählraumbeute ist größer;
- b) ^3H und ^{14}C können gleichzeitig gezählt werden;

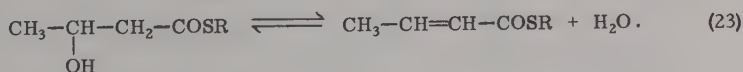
c) Die Zählung kann beliebig lange durchgeführt und beliebig oft wiederholt werden. Daher ist sie ihr an Empfindlichkeit und an Genauigkeit weit überlegen.

2. Versuche mit der Fettsäuresynthetase aus Hefe

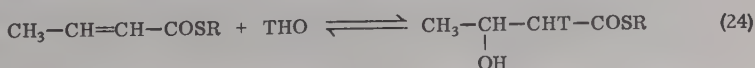
Kaliumborhydrid reduziert Acetoacetyl-thioester, der nach Beendigung der enzymatischen Reaktion an denaturierter Fettsäuresynthetase gebunden ist, zu β -Hydroxybutyryl-Enzym (14). Wie durch Arbeiten von E.H. FISCHER, WESTHEIMER und HORECKER bekannt ist (58), bewirkt KBH_4 trotz seiner potentiellen Fähigkeit, Disulfid-Bindungen zu spalten (59), keine Inaktivierung der untersuchten Enzyme. Auch die Aktivität von Hefe-Fettsäuresynthetase wird durch KBH_4 in einer Konzentration von 1-3 mM nicht beeinträchtigt, wie mit Hilfe optischer Bestimmungen in Gegenwart von KBH_4 gefunden wurde *.

Daß enzymgebundenes Acetoacetat der Reduktion durch KBH_4 zugänglich ist, zeigt das Radioaktivitäts-Diagramm eines Inkubationsansatzes von Fettsäuresynthetase mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA, Mal-CoA und KBH_4 (Abb. 19).

Es ist β -Hydroxybutyryl gebildet worden. Da KBH_4 mit dem Beenden der Reaktion durch Perchlorsäure zerstört wurde, kann es nur durch Reduktion während der enzymatischen Bildung des Acetoacetyl-Restes entstanden sein. Außer den erwarteten Gipfeln von Essigsäure- und β -Hydroxybuttersäure - tritt auch noch der von Crotonsäure-TMS auf. Authentische $3\text{-}^{14}\text{C}$ - β -Hydroxybuttersäure, den gleichen Aufarbeitungsbedingungen unterworfen, lieferte im Radiogaschromatogramm jedoch nur einen einzigen Gipfel, der sich als Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure identifizieren ließ. Damit war gezeigt, daß Crotonsäure nicht erst bei der Aufarbeitung entstanden sein konnte, sondern bereits am Enzym vorlag. β -Hydroxybutyryl-ACP wurde unter Wirkung des Teilenzym Dehydratase mit Crotonyl-ACP ins Gleichgewicht gebracht:



Das hat aber zur Folge, daß bei Durchführung des Versuchs in THO über die Rückreaktion Tritium in β -Hydroxybuttersäure eingebaut werden könnte



* Optischer Standard-Test (s. Abschn. C 4.)

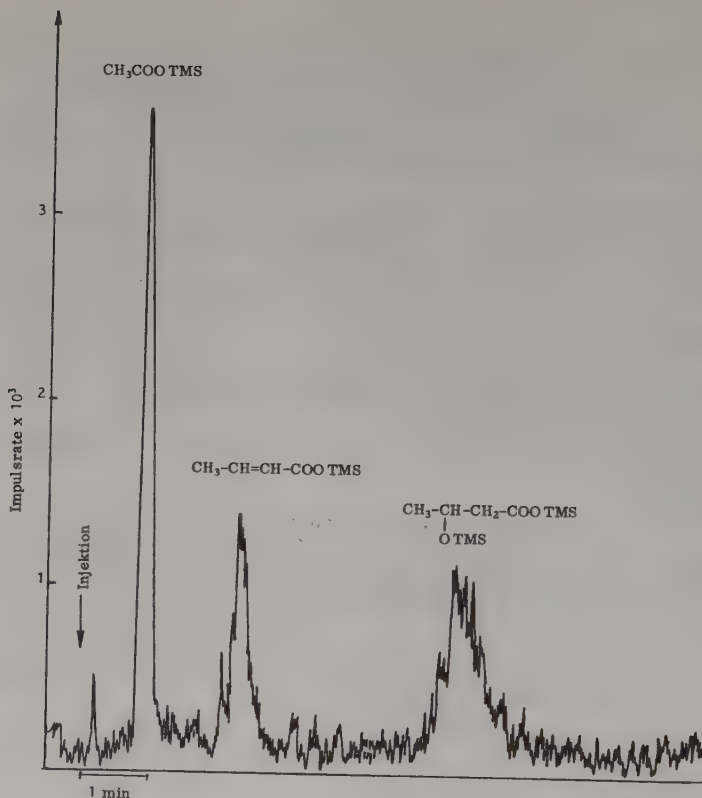
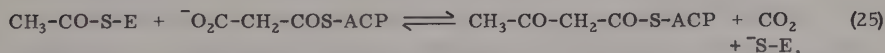


Abb. 19 Kaliumborhydrid-Reduktion zum Abfangen von enzymatisch gebildetem Acetoacetat: Radiogaschromatogramm. In einem Volumen von 1 ml wurden 100 μMol K-Phosphat pH 7.5, 30 μMol Cystein, 5 mg Fettsäuresynthetase (spez. Aktivität 1300 mE/mg) und 0.36 μMol 1-¹⁴C-Acetyl-CoA (spez. Akt. 0.42 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) 3 Min. bei 25° vorinkubiert. Nach Zugabe von 50 μl 0.1 M Kaliumborhydrid-Lösung (= 5 μMol) wurde mit 0.36 μMol Malonyl-CoA gestartet. Nach 1 Min. erneut Zugabe von 5 μMol Kaliumborhydrid, 2 Minuten nach Start wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl 70proz. Perchlorsäure beendet. Es wurden 15 μMol β -Hydroxybuttersäure als Träger zugegeben, 1/2 Stunde bei pH 13 und 37° verseift, dann bei pH 9 lyophilisiert. Der Rückstand wurde nach Ansäuern (pH 2-3) und Trocknen mit Natriumsulfat dreimal mit Äther extrahiert, der Extrakt eingedampft und der Rückstand mit einer Mischung von Trimethylchlorsilan, Hexamethyldisilazan und Bis-trimethylsilyl-acetamid trimethylsilyliert. Ein Aliquot wurde gaschromatographisch getrennt (NPGS-Säule, s. Abb. 12) und die ¹⁴C-Radioaktivität mittels einer nachgeschalteten Radiogaschromatographie-Einheit (entsprechend Abb. 18) aufgezeichnet.

und damit das Ergebnis verfälscht würde. Ein zuverlässiges Resultat wäre somit nur dann zu erhalten, wenn sich die Dehydratase durch spezifische Hemmung ausschalten ließe. Ein spezifischer Inhibitor der Dehydratase ist jedoch bisher nicht bekannt. Andererseits war die Spaltung der Fettsäuresynthetase aus Hefe trotz erzielter Fortschritte (60) noch nicht soweit gediehen, daß die Abtrennung der dehydratisierenden von der kondensierenden Einheit möglich war. Weitere Versuche zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden daher mit dem E.coli-Fettsäuresynthese-System vorgenommen, das schon unter den Bedingungen der Anreicherung in seine Komponenten zerfällt.

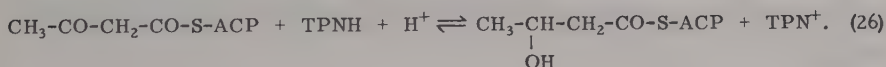
3. Versuche mit Enzymen des Fettsäuren synthetisierenden Systems aus E.coli

Die Kondensationsreaktion ist in Gleichung 25 summarisch wiedergegeben:



wobei "E-S" die Thiolgruppe des kondensierenden Enzyms symbolisiert, das diese Reaktion bewirkt. Sie entspricht der "peripheren" SH-Gruppe des Multienzym-Komplexes aus Hefe. Den Acetyl-Rest übernimmt das kondensierende Enzym von Acetyl-ACP. Acetyl- und Malonyl-ACP können außer durch enzymatischen Transfer von den entsprechenden CoA-Derivaten durch chemische Synthese hergestellt werden.

Statt Kaliumborhydrid sollte zur Reduktion des Acetoacetyl-ACP die dafür spezifische Reduktase dienen. Sie katalysiert folgende Reaktion:



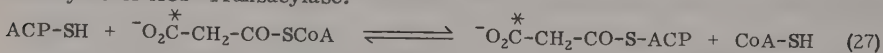
Für die Untersuchung der Kondensation war somit die Anreicherung von "Acyl-Carrier-Protein", des kondensierenden Enzyms und der β -Ketoacyl-ACP-Reduktase erforderlich.

a) Anreicherung von Proteinen des E.coli-Systems

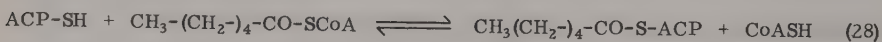
Für die Anreicherung der oben genannten Proteine standen E.coli-Bakterien eines zur Gewinnung von L-Asparaginase benutzten Stammes (Fa. Bayer) zur Verfügung. Seine Eignung zur Isolierung von Fettsäuresynthese-Enzymen wurde nach LENNARZ, LIGHT und BLOCH (17) mit dem Einbau von 1.2- ^{14}C -Malonyl-CoA in cis-Vaccensäure getestet, deren Bildung in genügend großer Menge radiogaschromatographisch nachgewiesen wurde.

Das Anreicherungsverfahren für "Acyl-Carrier-Protein" lehnt sich an die Arbeitsvorschriften von VAGELOS (61) und WILLECKE (62) an. Wesentliche Änderungen sind im experimentellen Teil beschrieben (S. 65). Wie Disk- und Cellogelelektrophorese ergaben, war ACP vollständig rein. Die Bestimmung seiner Aktivität erfolgte unter Ausnutzung der "Malonyl-CoA- $^{14}\text{CO}_2$ -Austauschreaktion" mit Malonyl- und Caproyl-CoA in Anlehnung an ALBERTS (63) mit Modifikationen von SIMONI (64) und WILLECKE (62). Die Gleichungen 27 bis 30 veranschaulichen das Prinzip der Bestimmung:

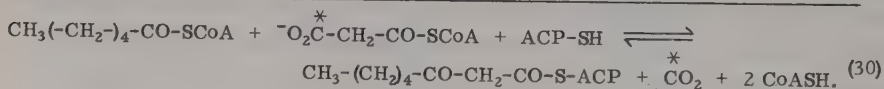
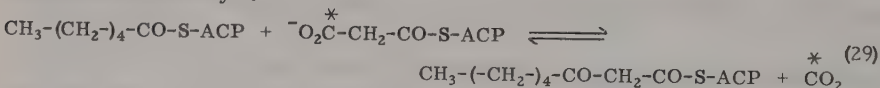
Malonyl-CoA-ACP-Transacylase:



Acyl-CoA-ACP-Transacylase:



Kondensierendes Enzym:



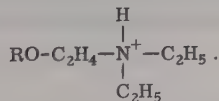
Durch die Umkehrung der Kondensation (Gl. 29) wird $^{14}\text{CO}_2$ als freie Carboxyl-Gruppe des Malonyl-CoA eingebaut und als "fixierte" Radioaktivität gemessen. Das kondensierende Enzym reagiert spezifisch nur mit ACP-Derivaten. Sind die, die Reaktionen 1 bis 3 katalysierenden Enzyme vorhanden, ist der $^{14}\text{CO}_2$ -Austausch von der Menge des ACP-SH abhängig.

Die Transacylasen und das kondensierende Enzym sind in einer Ammoniumsulfat-Fraktion des E.coli-Rohextraktes enthalten, die als "Fraktion A" bezeichnet wird. Für die Bestimmung wird Caproyl-CoA und nicht Acetyl-CoA eingesetzt, da Acetyl-CoA zwar unter Bildung von Acetoacetyl-ACP reagiert, Acetoacetyl-ACP sich aber bei Abwesenheit von TPNH weitgehend mit Malonyl-CoA weiter zu Triacetsäurelacton umsetzt (65). Diese Reaktion ist auch von der Fettsäuresynthetase aus Hefe bekannt (66). Da sie nicht umkehrbar ist, findet hierbei kein CO_2 -Austausch statt.

Die optimalen Bedingungen der ACP-Bestimmung wurden zunächst systematisch ermittelt (s. exp. Teil Abschn. 6d, Abb. 23-27 und Tab. 11). Da im Laufe dieser Arbeit zahlreiche ACP-Bestimmungen auszuführen waren, schien es aus ökonomischen Gründen zweckmäßig, die CoA-Derivate durch einfache Modellsubstrate zu ersetzen. Bei Versuchen mit der Hefe-Fettsäure-Synthetase fand SUMPER, daß S-Acetyl-N-acetyl-cysteamin und S-Malonyl N-capryloyl-cysteamin im Sättigungsbereich 70% der Aktivität der CoA-Substrate erreichen (67). Abb. 20 demonstriert, daß sich Malonyl-CoA auch im E.coli-System durch ein Cysteamin-Modellsubstrat, das S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin, ersetzen ließ *. Capronyl-CoA dagegen ließ sich nicht durch S-Capronyl-N-acetyl-cysteamin substituieren.

Während der ACP-Anreicherung wurden in den Fraktionen der 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie überraschenderweise zwei Gipfel mit ACP-Aktivität gefunden, und zwar bei Natriumchloridkonzentrationen des linearen Gradienten von 0.33 und von 0.45 M. Da der Puffer 0.01 M Thioglykol enthielt, war ausgeschlossen, daß der zusätzliche Gipfel von oxydiertem, dem dimeren ACP herrührte. Dem Problem zweier verschiedener ACP in einem Organismus nachzugehen, schien interessant zu sein, da Hinweise auf ACP oder ACP-ähnliche Proteine in der Literatur zu finden sind (71-76). Die Fraktionen der beiden ACP-Gipfel wurden getrennt aufgearbeitet und an DEAE-Cellulose- und DEAE-Sephadex-Säulen chromatographiert, bis die Cellogramme jeweils nur noch eine Bande zeigten. Disk- und SDS-Disk-Elektrophorese ergaben, daß beide Proteine identisch waren. Die Ursache der Auftrennung in scheinbar zwei ACP mußte in der Trennungsmethode selbst gelegen haben.

Die Bindungsstellen des Ionenaustauschers DEAE-Cellulose sind Ammoniumgruppen



* Hieraus wurde gefolgert, daß die Malonyl-CoA-ACP-Transacylase von E.coli vermutlich nach dem gleichen Prinzip arbeitet wie die der Fettsäuresynthetase aus Hefe, von der SCHWEIZER (68) und ZIEGENHORN (20) nachwiesen, daß sie kein SH-Enzym ist, sondern daß die OH-Gruppe eines Serinrestes am Transfer beteiligt ist. Bisher wurde behauptet, die E.coli-Transferase sei ein SH-Enzym (69, 70). Nachdem eine Untersuchung dieses Enzyms in Zusammenarbeit mit U. WEITHMANN geplant war, erschien eine Publikation von JOSHI und WAKIL (71), in der die obige Vermutung, daß auch die E.coli-Malonyl-CoA-Transferase kein SH-Enzym ist, bewiesen wurde.

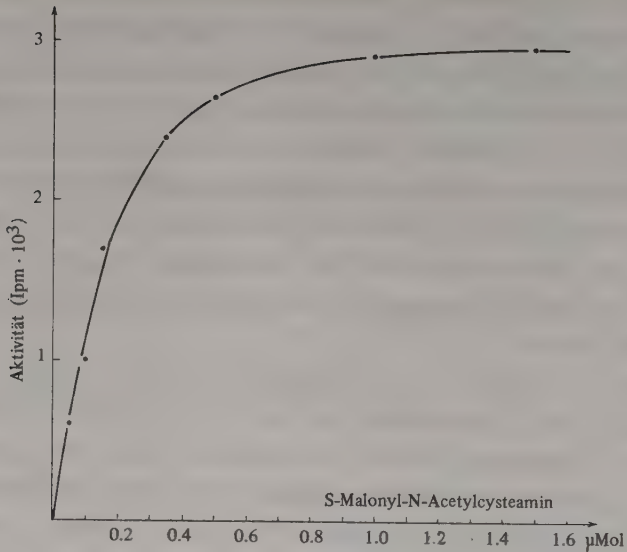


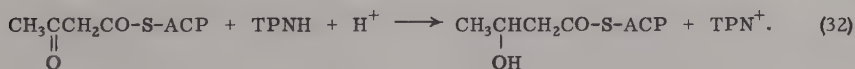
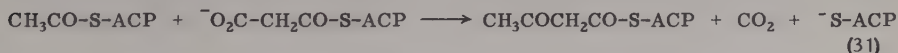
Abb. 20 Substrat-Abhängigkeit für S-Malonyl-N-acetylcysteamine im Malonyl-CoA-CO₂-Austauschtest

In einem Volumen von 0.6 ml wurden 50 µMol K-Phosphat pH 6.5, 20 µMol Thioglykol, 0.075 µMol Caproyl-CoA, 1.3 mg E.coli-Enzymfraktion A (Ammoniumsulfat-Fraktion 50-75 %), 0.9 γ Acyl-Carrier-Protein und S-Malonyl-N-acetylcysteamine, wie in Abszisse aufgetragen, 3 Min. bei 30° vorinkubiert; Start erfolgte mit 6 µMol NaH¹⁴CO₃ (spez. Akt. 2.3 · 10⁵ lpm/µMol). Nach 15 Min. bei 30° wurde die Reaktion mit 0.2 ml Eisessig beendet. Es wurden 0.2 ml auf Papierstreifen (7.5 · 3 cm, Whatman-I-Papier) aufgetragen, getrocknet und in Toluol-Szintillationslösung im Szintillationszähler gezählt.

Als pufferndes Ion bei der Säulenchromatographie wurde Phosphat benutzt, wie bei allen bisher beschriebenen ACP-Isolierungen der Arbeitskreise von VAGELOS, WAKIL und STUMPF (61, 77, 64). Das entgegengesetzt geladene Phosphat-Anion beteiligt sich am Ionenaustausch-Prozeß. Das kann zu lokalen Störungen im pH-Gleichgewicht führen. Als Folge davon können Adsorptions-Desorptionsvorgänge eines Proteins uneinheitlich verlaufen, so daß im Elutionsdiagramm mehrere Banden auftreten. Deshalb werden als Puffer bei DEAE-Austauschern neuerdings Alkylamine, also kationische Puffer empfohlen (78).

Die Vermutung der falschen Pufferwahl als Ursache läßt sich belegen. In Abb. 21 zeigt nur das Elutionsdiagramm der mit KPO_4 -Puffer äquilibrierten DEAE-Cellulose-Säule zwei Gipfel mit ACP-Aktivität. Chromatographie der gleichen ACP-Lösung mit Piperazin/HCl-Puffer unter sonst identischen Bedingungen führte nur zu einem Gipfel.

Das kondensierende Enzym wurde nach einer Vorschrift von GREENSPAN (49) angereichert und seine Aktivität dadurch bestimmt, daß nach Gleichung (31) und (32) die Kondensation zu Acetoacetyl-ACP mit dessen Reduktion gekoppelt wurde:



In Gegenwart von β -Ketoacyl-ACP-Reduktase und TPNH (oder der nicht sehr spezifischen β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und DPNH) kann die Geschwindigkeit der Kondensation anhand der Abnahme der TPNH- (oder DPNH-) Absorption bei 334 m μ verfolgt werden (80). Ziel der Reinigung war ein von Dehydratase freies Enzym. Das wurde erst mit dem 7. Trennungsschritt erreicht.

Die in Anlehnung an Verfahren von WAKIL (81) und VAGELOS (82) durchgeführte Anreicherung der β -Ketoacyl-ACP-Reduktase ist im experimentellen Teil beschrieben (s. S. 68). Die Bestimmung ihrer Aktivität erfolgte im Prinzip nach der oben angegebenen Gleichung (32). Anstelle des Acetoacetyl-ACP wurde jedoch S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin eingesetzt, das LYNNEN als Modellsubstrat für die Messung der 1. Reduktion der Fettsäuresynthese durch das Hefe-Enzym einführte (19). Im Vergleich zu WAKIL konnte bei der gleichen Anzahl von Trennungsschritten eine 3 600fache gegenüber einer 250fachen Anreicherung erzielt werden. Die Reduktase war frei von Dehydratase.

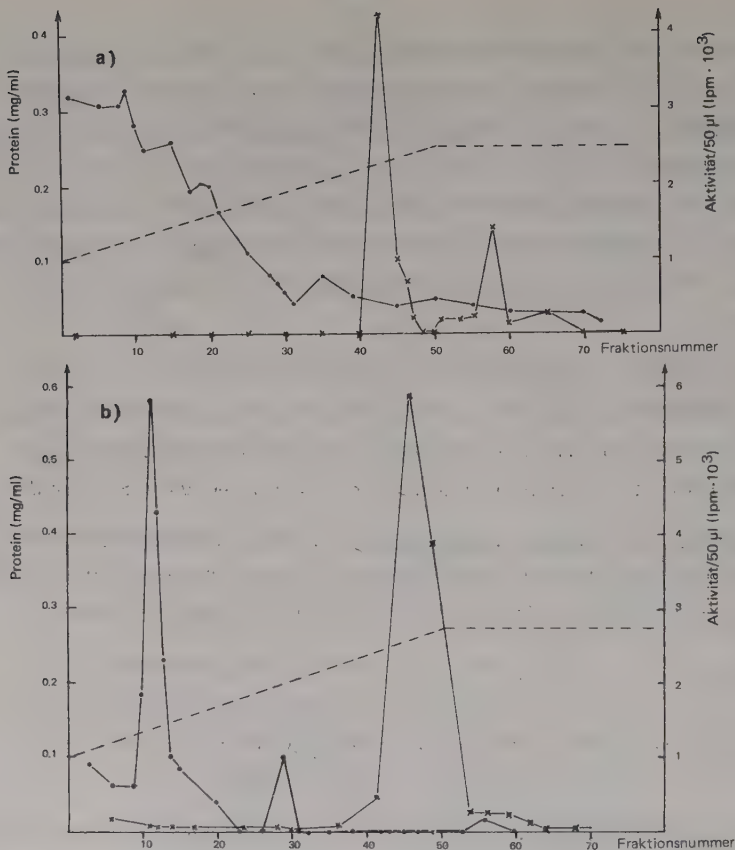


Abb. 21 DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie von Acyl-Carrier-Protein-Elutionsdiagramm.

—•—•— Proteinkonzentration, UV-spektroskopische Bestimmung bei 260/280 m μ ;

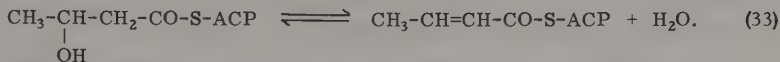
x — x — x Aktivität im Malonyl-CoA-CO₂-Austauschtest auf ACP,

----- Natriumchlorid-Gradient 0.2 M - 0.5 M.

a) Kaliumphosphat-Puffer pH 6.2 b) Piperazin/HCl-Puffer pH 6.2.

Beide Säulen (1.5 · 30 cm), die sich praktisch nur durch die Art des Puffers unterscheiden, wurden gleich behandelt: Äquilibrieren mit 0.01 M Puffer, der 0.02 M an Thioglykol war; Aufgeben von 60 mg ACP, säuregefällt und mit Streptomycinsulfat behandelt (s. exp. Teil, 6 e); Nachspülen mit 50 ml Puffer; Eluieren mit einem linearen Gradient von 0.2 M-0.5 M NaCl in 200 ml Puffer, mit dem äquilibriert worden war; Nacheluieren mit 100 ml 0.5 M NaCl in Puffer. Es war kein ACP auf den Säulen verblieben, da beim Nacheluieren mit 100 ml 1 M Natriumchlorid-Lösung keine ACP-Aktivität gefunden werden konnte. Die Gesamtmenge des eluierten ACP betrug bei Säule a) 746 mE, bei Säule b) 760 mE; sie war praktisch gleich (Abweichung 1.8%).

Bisher wurde zur Bestimmung der Aktivität der Dehydratase stets Crotonyl-ACP eingesetzt (83) und die Umkehrung der folgenden Reaktion gemessen:



Crotonyl-ACP kann wegen der reaktionsfähigen Doppelbindung mit Ausbeuten von höchstens 15%, auf ACP bezogen, synthetisiert werden (83). Versuche, dieses Enzym ähnlich der Dehydratase des Multienzymkomplexes aus Hefe mit S-β-Hydroxybutyryl-N-acetyl-cysteamin als Modellschubstanz zu bestimmen, mißlangen auch bei der sehr großen Konzentration von 40 mM an Modellschubstanz. Das E.coli-Enzym benutzt ausschließlich ACP-Derivate als Substrate. Es wurde erstmals β-Hydroxybutyryl-ACP zur Bestimmung eingesetzt. Nach Gleichung (33) entstand Crotonyl-ACP, dessen Bildung anhand seiner Extinktion bei 263 mμ photometrisch verfolgt wurde. β-Hydroxybutyryl-ACP wurde mit einer Ausbeute von 60% durch Umesterung von S-β-Hydroxybutyryl-N-acetyl-cysteamin mit ACP-SH hergestellt.

b) Darstellung der ACP-Derivate

1-¹⁴C-Acetyl-ACP wurde durch Acetylierung von frisch reduziertem ACP mit 1-¹⁴C-Acetanhydrid hergestellt. Insbesondere für die genaue Bestimmung der ¹⁴C-Markierung von Acetyl-ACP ist eine zuverlässige und schnelle Proteinbestimmung von kleinen Substanzmengen wichtig *. Die Biuret-Methode von GORNALL (84) wurde auf kleinere Dimensionen adaptiert, so daß im Bereich von 5-100 γ Protein wie bei dem zeitaufwendigeren Verfahren nach LOWRY (85) schnell und reproduzierbar gemessen werden konnte (85% oder 11 von 13 der Bestimmungen einer Testserie lagen in einem Fehlerbereich von 0-5%).

Die von NAGAI und BLOCH beschriebene Methode zur Bestimmung des Thioester-Gehaltes von ¹⁴C-Acyl-ACP-Derivaten (87) war bei kleinen Mengen zu ungenau. Deshalb wurde die Hydroxamsäure-Methode von STADTMAN (88) so abgewandelt, daß noch Mengen von 2.5-10 nMol exakt erfaßt werden konnten. Dabei wurde gefunden, daß die

* Die UV-spektroskopische Proteinbestimmung durch Messen der Absorption bei 215 und 225 mμ (86) war wegen Störungen durch Salze und Thiol-Gruppen nicht brauchbar.

Extinktion der Malonyl-hydroxamsäure in FeCl_3 -Lösung beträchtlich von derjenigen der Acethydroxamsäure abweicht (s. exp. Teil S. 73). Mit diesen Messungen übereinstimmende Werte des Thioestergehaltes konnten auch mit Hilfe der verzögerten Nitroprussid-Reaktion nach LYNEN (89) erhalten werden.

Nur 20% der Radioaktivität des $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-ACP sind als Thioester gebunden. Das weist darauf hin, daß die Aminogruppen der 4 Lysin-Reste ebenfalls quantitativ acetyliert worden sind, was nach MAJERUS (90) aber keinen Aktivitätsverlust des ACP zur Folge haben soll.

Malonyl-ACP wurde analog der Malonyl-CoA-Darstellung nach EGGERER und LYNEN (91) durch Umesterung von S-Malonyl-N-acetylcysteamin mit ACP gewonnen. Durch Isotopenaustausch in tritiiertem Wasser ließ sich 2-T-Malonyl-ACP darstellen. Malonyl-ACP wurde mit der Hydroxamsäure-Methode bestimmt, außerdem enzymatisch entsprechend der Bestimmung des kondensierenden Enzyms nach Gleichung (31) und (32), mit dem Unterschied, daß hier ein Überschuß an kondensierendem Enzym zugesetzt wurde. Die Reaktion lief dadurch rasch bis zum vollständigen Verbrauch des Malonyl-ACP ab, der dem photometrisch gemessenen TPNH-Verbrauch äquivalent war.

c) Kinetischer Isotopeneffekt durch D-Malonyl-ACP?

Die Möglichkeit, durch Einsatz von Acetyl- und Malonyl-ACP, kondensierendem Enzym und Reduktase (nach Gl. (31), (32), S. 39) die Kondensationsreaktion gesondert zu untersuchen, wurde zunächst zur Bestimmung des kinetischen Deuterium-Isotopeneffektes bei dem E.coli-System genutzt. In dem zur Bestimmung des kondensierenden Enzyms angewandten optischen Test (S. 39) wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten mit H- und D-Mal-ACP jeweils in H_2O und D_2O ermittelt, als deren Maß ΔE pro Min. in Tab. 7 angegeben ist.

Wegen der kostbaren ACP-Derivate wurden nur je 5 Bestimmungen in H_2O und in D_2O ausgeführt, die Ergebnisse zeigen jedoch deutlich:

Es ist kein Lösungsmittel-Isotopeneffekt vorhanden.

In Übereinstimmung mit den Befunden an der Fettsäure-Synthetase aus Hefe tritt kein Isotopeneffekt durch D-Malonyl-thioester auf.

Tabelle 7 Untersuchung des Lösungsmittelisotopeneffektes bei der Kondensationsreaktion. Optischer Test mit Hilfe des E.coli-Systems: Acetyl- und Malonyl-ACP, kondensierendes Enzym und 1. Reduktase.

H- oder D-Mal-ACP	H ₂ O		D ₂ O	
	$\Delta E \cdot 10^{-3}$ [min ⁻¹]	Relat. Fehler (%)	$\Delta E \cdot 10^{-3}$ [min ⁻¹]	Relat. Fehler (%)
H-Mal-ACP	46.8	+2.7	46.8	+2.1
	45.3	-0.6	50.5	+10.3
	43.0	-5.8		
D-Mal-ACP	45.3	-0.6	43.5	-5.0
	46.8	+2.7	42.0	-8.3
			45.8	0
Mittelwerte:	<u>45.5</u>		<u>45.8</u>	

Optischer Test bei 334 m μ und 25⁰, 0.25 ml Küvette, Blende 1*4 mm. In einem Volumen von 0.12 ml waren enthalten: 10 μ Mol Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0, 10 μ Mol Cystein, 20 γ Rinder-Serumalbumin, 0.1 μ Mol TPNH, 50 mE β -Ketoacyl-ACP Reduktase aus E.coli, 0.5 mE kondensierendes Enzym (β -Ketoacyl-ACP-Synthase) aus E.coli (spez. Aktivität 1.17 E/mg) 5 nMol Acetyl-ACP. Nach 2.5 Minuten Vorinkubation und Beobachtung des Blindlaufes erfolgte Start mit 5 nMol H- oder D-Malonyl-ACP, wie angegeben. Der Deuteriumoxid-Gehalt betrug 50%. Würde hier der gleiche Lösungsmittel-Isotopeneffekt auftreten wie bei der Reaktion der Fettsäure-Synthetase aus Hefe (82% D₂O, $k_{H_2O}/k_{D_2O} = 1.55$), sollte dieser D₂O-Gehalt ausreichen, ihn zu entdecken. Nach (33) wäre hier der Isotopeneffekt 1.24. Er würde eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit von $\Delta E = 45.8 \cdot 10^{-3}/\text{min}$ auf $\Delta E = 34.6 \cdot 10^{-3}/\text{min}$ bewirken und wäre somit leicht festzustellen gewesen.

d) Die Kondensations-Reaktion in Tritiumwasser

 ber die enzymatische Synthese von 3-¹⁴C- β -Hydroxybuttersäure in Gegenwart von tritiiertem Wasser gibt Tab. 8 Aufschluß.

Tabelle 8 Enzymatische Synthese von 3-¹⁴C-β-Hydroxybuttersäure in Gegenwart von tritiiertem Wasser.

Vers. Nr.	1- ¹⁴ C-Acetyl-ACP (nMol)	Malonyl-ACP (nMol)	β-Hydroxy-buttersäure			
			(nMol)	T-Markierung (dpm)	T-Markierung - Blindwert (dpm)	relative T-Markierung (μMol T/μMol β-Hydroxybuttersäure)
1	-	-	-	300	-	-
2	10	10	1.3	280	0	0
3	20	20	2.0	303	0	0
4	40	40	7.0	620	320	0.01
5	40	40	6.4	23 170	22 870	1.73

Die Inkubationsmischung enthielt in einem Volumen von 0,5 ml: 50 μMol K-Phosphat-Puffer pH 7,0, 0,1 μMol Äthylendiamintetraessigsäure, 5 μMol Thioglykol, 1 μMol TPNH, 170 mE gereinigtes kondensierendes Enzym (β-Ketoacyl-ACP-Synthetase) aus E.coli, 1 000 mE β-Ketoacyl-ACP-Reduktase aus E.coli, 1-14-C-Acetyl-ACP und Malonyl-ACP wie angegeben und 46,85 mCi Tritium-Wasser ($1,04 \cdot 10^{11}$ dpm) entsprechend einer spezifischen Markierung von $3,74 \cdot 10^5$ dpm/nMol H₂O. Es wurde 2 Min. bei 25° vorinkubiert und mit Malonyl-ACP gestartet. Nach 2 Min. wurde die Reaktion mit 10 μl 70proz. Perchlorsäure beendet. 15 μMol β-Hydroxybuttersäure als Träger wurden zugegeben, bei pH 13 und 37° 30 Min. verseift, anschließend das Protein mit 20 μl Perchlorsäure gefällt, abzentrifugiert und der Überstand bei pH 9 lyophilisiert, mit 1 ml Wasser aufgenommen, erneut lyophilisiert und dies solange wiederholt, bis das Lyophilisat weniger als 5 000 dpm an Tritium pro ml enthielt. β-Hydroxybuttersäure wurde aus dem angesäuerten Rückstand mit Äther extrahiert, gaschromatographisch, wie in Abschnitt B II 1 b und Abb. 15 dargestellt, gereinigt und seine Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

Versuch 5 unterscheidet sich von den vorhergehenden darin, daß die Reduktase erst nach Synthese des Acetoacetyl-ACP, und zwar 2 Min. nach dem Malonyl-ACP-Start, zugegeben und von da ab noch 2 Min. inkubiert wurde.

Bei dem großen Überschuß von Enzymen wäre quantitativer Umsatz der eingesetzten Substrate zu erwarten. Als Ursache für die geringen Ausbeuten an isolierter β -Hydroxybuttersäure wurden Aufarbeitungsverluste festgestellt (s. exp. Teil, S. 74, Abschn. 6j, Tab. 15). Aber selbst Versuch 2, bei dem nur 1,3 nMol isoliert wurden, hätte bei Einbau von einem tritiierten Proton aus dem Lösungsmittel pro Molekül β -Hydroxybuttersäure zur Registrierung von 2430 dpm über dem Blindwert führen müssen. Das war nicht der Fall. In Versuch 5 wurde Acetoacetyl-ACP nicht sofort durch Reduktion abgefangen, sondern die Reduktase erst 2 Min. nach dem Start der Kondensations-Reaktion zur Inkubationsmischung hinzugefügt. Dadurch erhielt der Acetoacetyl-Rest Gelegenheit zum Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel *. Das Experiment zeigt, daß unter diesen Versuchsbedingungen tatsächlich Tritium-Aktivität im Reaktionsprodukt gemessen wird, die Methode ist also zuverlässig.

In den Experimenten 1-4 wurde kein Tritium eingebaut. Könnte dieses Ergebnis das Resultat eines Isotopeneffektes sein? Im Falle eines Isotopeneffektes von 7, wie er bei der Spaltung einer T-O-Bindung beim Einbau von Tritium aus HOT auftreten kann (36), wäre in Versuch 4 die theoretische Tritium-Markierung von 13090 auf 1870 verringert worden, und wäre bei weitem noch feststellbar gewesen.

Das Ergebnis wurde mit folgender Versuchsanordnung einem kritischen Test unterzogen.

e) Die Kondensations-Reaktion mit tritiiertem Malonyl-ACP

Setzt man tritiiertes Malonyl-ACP ein, sollte in Umkehrung zu den vorigen Versuchen der Tab. 8 die für einen konzertierten Mechanismus sprechen (vgl. Tab. 1, S. 9), die Tritium-Markierung vollständig erhalten bleiben. Nach dem "Claisen-Typ-"Mechanismus würde die β -Hydroxybuttersäure nur noch den halben Tritium-Gehalt wie das eingesetzte T-Malonyl-ACP haben. Um die mögliche Bevorzugung von H gegenüber ^3H einzuschränken, wurde parallel zu T,H-Malonyl-ACP auch tritiiertes Deutero-malonyl-ACP (T,D-Malonyl-ACP) hergestellt und eingesetzt. Bei der Alternative T oder D ist die "Diskriminierung" gegen T erheblich vermindert (nach (36) auf 1/4). Tab. 9 zeigt die Ergebnisse.

* Daß nicht die maximale Zahl von 2,0 T eingebaut wurde, könnte daran gelegen haben, daß die Kondensation noch nach Zugabe der Reduktase weiterlief und hierbei natürlich kein T-Einbau mehr stattfand.

Tabelle 9 Die Kondensations-Reaktion mit tritiiertem Malonyl-ACP

Vers. Nr.	Malonyl- markierung	β -Hydroxy- buttersäure (gemessen)	dem entsprechen an T-Mal-ACP (berechnet)	β -Hydroxy- buttersäure (gemessen)	$\frac{T}{T}$ (β -Hydroxybuttersre.) (Malonyl-ACP)
		^{14}C (dpm)	^3H (dpm)	^3H (dpm)	
1	T,H	533	1 382	1 390	1.00
2	T,H	363	941	930	0.99
3	T,D	527	1 497	1 413	0.94
4	T,D	972	2 761	2 802	1.01
Mittelwert 0.98					

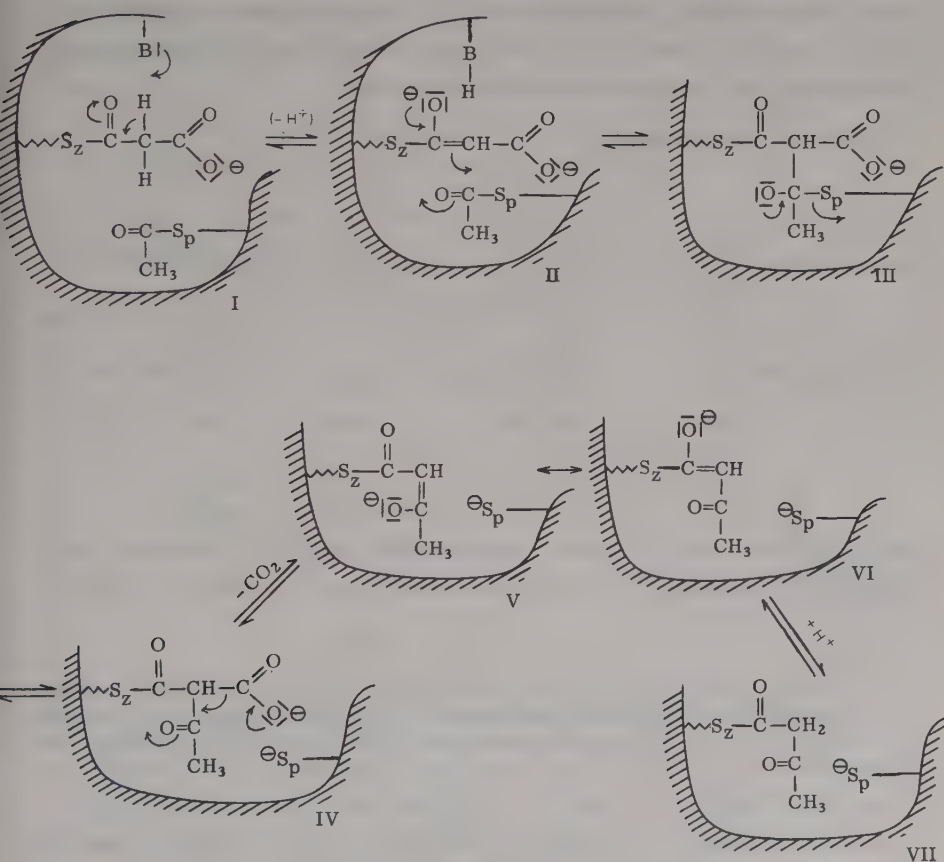
Die Inkubationsmischung enthielt in einem Volumen von 0.5 ml: 50 μMol K-Phosphat pH 7.0, 0.1 μMol Äthylendiamin-tetraessigsäure, 5 μMol Thioglykol, 1 μMol TPNH, 100 mE gereinigtes kondensierendes Enzym aus E.coli (β -Ketoacyl-ACP-Synthase), 1000 mE β -Ketoacyl-ACP-Reduktase aus E.coli, 20 nMol 1- ^{14}C -Acetyl-ACP (0.707 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$). Nach 3 Min. Vorinkubation bei 25° erfolgte Start mit 20 nMol T,H-Malonyl-ACP (1.83 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$, Vers. 1 und 2) oder mit 20 nMol T,D-Malonyl ACP (2.01 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$, Vers. 3 und 4). Nach 2 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl HClO_4 (70%) beendet. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Tab.8 beschrieben.

Die Markierung des Malonyl-ACP blieb erhalten, es fand kein Protonen-Austausch statt.

III. Zusammenfassende Diskussion

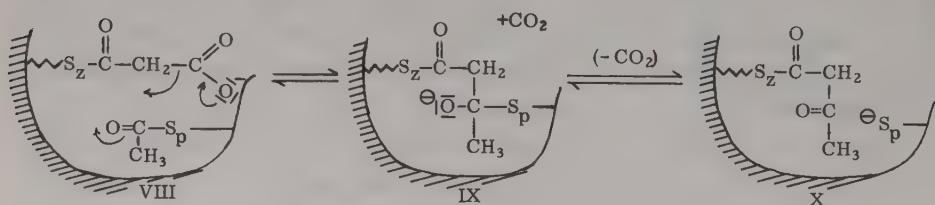
Ziel der geschilderten Untersuchungen war, einen Einblick in den mechanistischen Ablauf der Kondensationsreaktion der Fettsäuresynthese zu erhalten. In der Einleitung wurden zwei zur Diskussion stehende Mechanismen vorgestellt (S. 6) und mögliche Effekte bei Einsatz von Isotopen-markiertem Substrat und Lösungsmittel besprochen (S. 7). Da bei der Diskussion des weiter unten vorgeschlagenen Mechanismus Parallelen zur Claisen-Reaktion gezogen werden, soll zunächst von dieser die Rede sein.

1. Mechanismus 1 "Claisen"-Reaktion (Abb. 22)



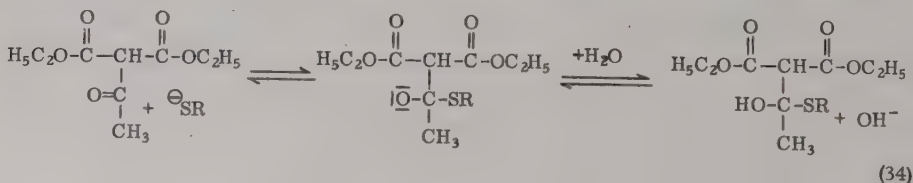
Primär erfolgt Ablösung eines Protons (I). Die Bildung von Carbanionen in enzymatischen Reaktionen wird als nicht sehr wahrscheinlich angesehen (92). Der deprotonierte Malonyl-Rest wird deshalb als Enolat wiedergegeben (II). Hier sind die negativen Ladungen energetisch günstiger über das Molekül verteilt. Ob ein Enol entsteht, kann nicht entschieden werden. Da das Enolat (oder Enol) sehr reaktionsfähig ist (vgl. EGGERER, 35), wird die C-C-Knüpfung als nucleophiler Angriff direkt an der Carbonylgruppe ohne Unterstützung durch Protonenkatalyse formuliert (II). Das dabei entstehende Thiohalbacetal-Anion (III) zerfällt äußerst schnell *. Dabei wird die "periphere" Thiolgruppe freigesetzt, die als Thiolat vorliegt (21). Da sich die Carboxylat-Gruppe jetzt in β -Stellung zu zwei Carbonyl-Gruppen befindet (IV), wird die Decarboxylierung durch die Bildung des mesomeriestabilisierten Enolates (V, VI) begünstigt. Aufnahme eines Protons führt zur Ketoform des Acetoacetyl-thioesters (VII).

2. Konzertierte Reaktion (Abb. 23)



"Konzentriert" muß nicht so verstanden werden, daß Lösung ($-\text{C}-\text{CO}_2$, $-\text{C}-\text{S}-$) und Knüpfung ($-\text{C}-\text{C}-$) sämtlicher an der Reaktion beteiligten Bindungen gleichzeitig erfolgt.

* Wie aus der Chemie der Thiohalbacetale bekannt ist (93) und auch an der Verbindung folgender Struktur gezeigt wurde, erfolgt die (reversible) Spaltung der C-S-Bindung schneller als ein Proton herandiffundieren oder sich von einem H_2O -Molekül trennen kann (94).

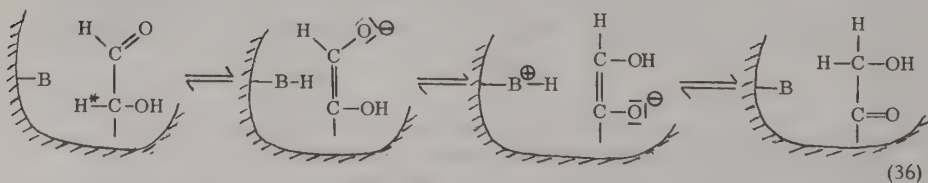


Schritt als die Deprotonierung die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt (z.B. die nachfolgende Decarboxylierung). Sie schließt also eine Deprotonierung der Malonylgruppe und damit einen "Claisen-"Mechanismus nicht aus.

Die Austausch-Studien mit tritiiertem Lösungsmittel und mit tritiiertem Malonyl-ACP zeigten, daß während der Kondensations-Reaktion die Methylen-Protonen der Malonylgruppe nicht gegen Protonen des Lösungsmittels ausgetauscht werden, und sie bestätigen somit den Hinweis auf einen konzertierten Mechanismus. Inwieweit kann dieses Ergebnis als Beweis des konzertierten Mechanismus herangezogen werden?

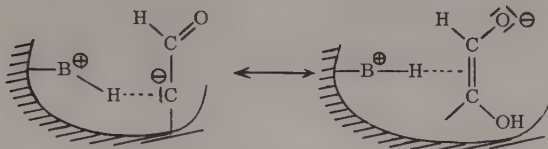
Nach dem "Claisen-Typ"-Mechanismus wird primär ein Proton entfernt. Dieses Proton könnte zurückübertragen werden, sobald die C-C-Bindung geknüpft ist. Für Rückübertragungen von Protonen gibt es bereits Beispiele aus der Literatur, deren Diskussion jedoch eine Rückübertragung bei dem möglichen Fall einer "Claisen-Typ"-Reaktion wenig wahrscheinlich macht. Diese Beispiele lassen sich in zwei Gruppen gliedern:

1. Coenzym-abhängige Reaktionen (Vitamin B₁₂: z.B. Methylmalonyl-CoA-Isomerase (41); NAD⁺: UDP-Galaktose-4-Epimerase (95)). Sie brauchen hier nicht diskutiert zu werden, da das kondensierende Enzym, soweit bekannt ist, kein Coenzym enthält oder benötigt. 2. Coenzym-unabhängige Reaktionen (Phosphohexose-Isomerase (96), Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase (99) und Aconitase (113)). Sie katalysieren Isomerisierungen. Man nimmt an, daß durch den Angriff einer am Enzym gebundenen Base ein Proton aus dem Substrat entfernt wird (96). Dadurch entsteht am Substrat eine Doppelbindung. Das Proton wird zurückübertragen und an das benachbarte C-Atom gebunden. Der Mechanismus soll am Beispiel der Phosphohexose-Isomerase demonstriert werden (96):



Folgende Hypothese soll die Erhaltung der Protonenmarkierung bei den genannten Reaktionen erklären. Durch die Ablösung des Protons wird die Base positiviert, das Substrat-Molekül bleibt negativ geladen zurück. Es entsteht ein Ionenpaar, das durch eine Wasserstoffbrücke miteinander verbunden ist. Diese wird auch zwischen der protonierten Base

und der nucleophilen π -Bindung des Substrates bestehen bleiben.



Diese Wasserstoff-Brücke ist hier das Analogon der "Wasserstoffbrücken-Komplexe", die bei der Beschreibung des Protonenaustausches von Peptidbindungen postuliert wurden (97, 98). Das entfernte Proton kann nicht sofort den Anziehungsbereich des Substrates verlassen. Der Wasserstoffbrücken-Komplex ist die Zwischenstufe, die beide Isomere bei der Umlagerung ineinander durchlaufen. Das (deprotonierte) Substrat wird bevorzugt mit diesem Proton reagieren ^{*}, dessen Austausch-Geschwindigkeit durch die Wasserstoffbrücke erniedrigt ist. Es verbleibt also im Molekül.

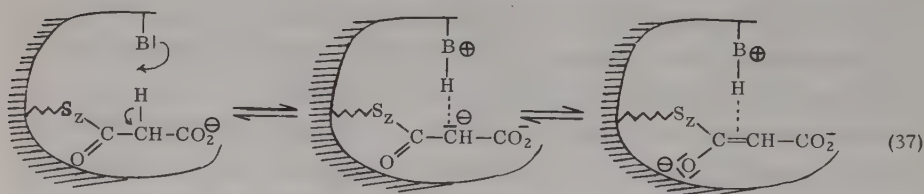
Für die Hypothese sprechen: Es tritt ein positiver Deuterium-Isotopeneffekt auf (Phosphohexose-Isomerase 1.86 (96). Da der Wasserstoff keine feste kovalente Bindung eingeht, wie es bei einer Hydrid-Übertragung der Fall wäre, sondern als Proton reversibel an die basische Gruppe unter Ausbildung einer Wasserstoffbrücke gebunden wird, findet partieller Austausch mit dem Lösungsmittel statt ($G-6-P \rightleftharpoons F-6-P$: 39%), der mit steigendem Reaktionsumsatz (höhere Enzymmenge und längere Inkubationszeit (vgl. 99)) und mit steigender Temperatur ($G-6-P \rightleftharpoons F-6-P$: 0° 17%, 20° 39% (96)) zunimmt.

Es genügt also die Annahme eines Wasserstoffbrücken-Komplexes, um die Erhaltung der Markierung zu erklären. Als nicht notwendig erscheint es, einen vom Lösungsmittel abgeschirmten Enzym-Bereich einzuführen, wie man das vordem getan hatte (vgl. 96). Die Annahme eines solchen Bereiches zur Erklärung der bekannten Protonen-Rückübertragungen erscheint nicht sinnvoll, da die Hypothese der Wasserstoffbrücken-Komplexe den stets gefundenen partiellen Austausch mit dem Lösungsmittel zwanglos erklären kann und somit den experimentellen Befunden besser gerecht wird.

* Bei der Reaktion mit einem Proton des Lösungsmittels müßte zuerst unter Aufbringung von Aktivierungsenergie ein entsprechender Komplex mit dem Lösungsmittel gebildet werden (98).

Es besteht deshalb kein Grund, für die mögliche, unter Deprotonierung verlaufende "Claisen-Typ"-Reaktion der Kondensation einen abgeschirmten Enzym-Bereich anzunehmen, wenngleich man diese Möglichkeit nicht restlos ausschließen kann. Nur in diesem wenig wahrscheinlichen Fall wären Nicht-Austausch der Protonen und "Claisen"-Mechanismus miteinander vereinbar. Wahrscheinlich werden Röntgenstruktur-Analysen mit hoher Auflösung notwendig sein, um darüber zu entscheiden.

Wenden wir diese Vorstellungen des Wasserstoffbrücken-Komplexes auf die Kondensationsreaktion der Fettsäuresynthese an: Bei Ablauf der Reaktion nach dem Claisen-Mechanismus kann sich zwar ebenfalls durch den Angriff einer enzymgebundenen basischen Gruppe auf ein Methylen-Proton des Malonyl-Restes ein Wasserstoffbrücken-Komplex ausbilden.



Er wird aber zerstört, wenn die Doppelbindung des Enolats bei der Knüpfung der neuen C-C-Bindung verschwindet (III S. 47). Das Proton kann jetzt leichter austauschen. Bei der Rückübertragung auf das veränderte Molekül besitzt es gegenüber den Lösungsmittel-Protonen nicht mehr den Vorteil eines schon assoziierten, über die Wasserstoffbrücke gebundenen Protons. Lösungsmittel-Protonen werden gleichberechtigt reagieren. Es wird also nicht nur ein partieller Austausch wie bei den oben erwähnten Reaktionen sondern ein praktisch vollständiger Austausch mit den Lösungsmittel-Protonen auftreten: Im Fall der Verwendung tritiierten Wassers erscheint Tritium in der isolierten β -Hydroxybuttersäure. Im Fall von T-Malonyl-ACP gehen dem Reaktionsprodukt 50% der Tritium-Atome verloren. Das aber wurde nicht festgestellt. Tab. 8 und 9 zeigen, daß die Protonen vollständig erhalten bleiben. Darüber hinaus ist bei den Beispielen aus der Literatur (s.o.), mit der Erhaltung der Markierung ein kinetischer Isotopeneffekt verbunden. Bei der Kondensation tritt dieser jedoch nicht auf.

Aus diesen Gründen betrachten wir die Versuchsergebnisse als Beweis des konzertierten Mechanismus.

C. Experimentelle Einzelheiten

1. Geräte

Photometer Eppendorf, Fa. Netheler und Hinz, Hamburg, mit und ohne Philipps-Kompensograph

Spektralphotometer Zeiss, Modell M 4 Q II

Registrierendes Spektralphotometer Cary, Modell 14

Präparative Ultrazentrifuge, Beckman, Spinco Modell L, Rotor 40

Servall Automatic Superspeed Centrifuge RC-2, Rotor GSA

Zentrifuge, Stock (Marburg)

Fraktionskollektor Radirac, LKB, Stockholm

Kofler Heizmikroskop, C. Reichert, Wien

pH-Meter, Püsl, München, Typ 11/12

Labor-pH-Meter, Knick, Berlin 37

Mikroliterspritzen Hamilton, G. Schmidt, Hamburg

Glaselektroden, Ingold, Frankfurt

Camag Gleichspannungs-Speisegerät 1200 V

Pherograph nach Wieland-Pfleiderer, Hormuth u. Vetter

Menton-Gauling-Homogenizer

Rotavapor R, Büchi

Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 314 EX

und 3380 mit Automatic Activity Analyzer, Packard, Frankfurt/M.

Gaschromatograph Aerograph 1520, Varian Aerograph, Darmstadt.

Folgende Geräte wurden zu einer Radiagaschromatographie-Einheit zusammengeschaltet:

Aerograph 1520 mit W-Filamenten im Wärmeleitfähigkeits-Detektor, heizbare

Verbindungsleitung (Eigenbau Mosbauer), Tri-Carb Verbrennungsofen, Modell 325,

Tri-Carb Szintillations-Spektrometer Modell 2101 mit Gasdurchfluß-Zelle

(Volumen etwa 8 ml), Einkanal-Ratemeter Modell 280 A, Packard, 2 Kompensations-

schreiber Typ 5015, Meßbereich 0-1 mV, Honeywell, Frankfurt/M.

Hochdruckdampf-Sterilisator, Küster, Stuttgart

NMR-Spektrometer, Varian A 60

2. Materialien

Coenzym A, DPN, DPNH, TPNH, β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, Citratsynthase, Malat-Dehydrogenase (Boehringer Mannheim); Serumalbumin vom Rind (Behring-Werk, Marburg); Dithiotreitol (Calbiochem, Luzern); Thioglykol, β -Hydroxybuttersäure (Na-Salz), Crotonsäure, Piperazin, Triäthanolamin-Hydrochlorid, Streptomycin-Sulfat (C. Roth, Karlsruhe); Sephadex G 25, G 75, G 100, G 200, DEAE-Sephadex (Pharmacia, Uppsala); DEAE-23-Cellulose (Whatman); Dialyse-Schlauch Visking 8/32 oder 23/32 Dowex 50 $\cdot$ 8, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, Coomassie brilliant blue G 250, Cellogel (Serva, Heidelberg); Szintillatoren: PPO, Dimethyl-POPOP (Interchem. München); Na- ^{14}C -Hydrogencarbonat, Na-(1- ^{14}C)Acetat, (1- ^{14}C)Acetanhydrid, (3- ^{14}C) β -Hydroxybuttersäure, ^3H -Wasser, 1- ^{14}C - und 1,2- ^3H -n-Hexadecan-Standard (Radiochemical Centre, Amersham); p-Phenyl-phenacylbromid (EGA-Chemie); NPGS, Chromosorb Waw, Porapak Q (Varian Aerograph, Darmstadt); Dinonyl-phthalat wurde freundlicherweise von Herrn H. Huber, Organisch-chemisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Für Dialyse-Puffer wurde entionisiertes, für alle anderen Zwecke entionisiertes und sterilisiertes Wasser verwendet.

3. Synthetisierte und isolierte Präparate

Acetyl-CoA wurde nach (100), 1- ^{14}C -Acetyl-CoA nach (14), Malonyl-CoA nach (91), S-Malonyl-N-acetylcysteamin nach (62), S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin nach (62, 101) und S- β -Hydroxybutyryl-N-acetyl-cysteamin nach (102) hergestellt.

S-Acetyl-N-succinyl-cysteamin und Acethydroxamsäure wurden uns von Herrn Dr. K. Willecke überlassen.

Caproyl-CoA wurde in Anlehnung an eine von W. Seubert ausgearbeitete Methode durch Umsetzung von Capronsäureanhydrid mit Coenzym A nach (103) wie folgt gewonnen: In einem Reagenzglas mit Schliff werden 25 mg (28,7 μMol) CoASH, 50 mg KHCO_3 , 1 ml H_2O und 1 ml Tetrahydrofuran (peroxid-frei, frisch über Aluminiumoxid-Säule

(basisch) gereinigt) gemischt, in Eis gestellt und Stickstoff eingeleitet. Es werden 0,052 ml (230 μ Mol) Capronsäureanhydrid zugegeben und die Mischung im verschlossenen Glas unter Stickstoff bei 0° und heftigem Rühren 1/2 Stunde stehen gelassen. Nach Zugabe von Dowex 50 • 8, H-Form, wird 5 Min. bei Zimmertemperatur, anschließend 3 Stunden bei 0° perforiert, nach Wechsel des Äthers noch 2 Stunden. In die Vorlage werden 2 ml 2 N NaOH gegeben. Dowex wird abgenutscht, der restliche Äther am Rotationsverdampfer entfernt und die Lösung mit festem KHCO_3 bis pH 5-6 neutralisiert. Die Bestimmung des Caproyl-CoA erfolgte mit Hilfe des Hydroxamsäure-Testes. Die Ausbeute beträgt 80-97% (auf CoASH bezogen).

Fettsäuresynthetase aus Hefe

Die Anreicherung erfolgte wie von OESTERHELT (21) und LYNEN (104) beschrieben.

"Enzymfraktion A"

Sie wurde zur Bestimmung von Acyl-Carrier-Protein benutzt und nach MAJERUS (61) gewonnen, aber noch zusätzlich in Anlehnung an ein von W. WINNEWISSER (105) benutztes Verfahren gereinigt. Der zentrifugierte Niederschlag der während der ACP-Isolierung bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 40-75% gefällten Proteinfraction wird gegen 0,02 M K-Phosphat-Puffer pH 7,0, der 0,05 M an Thioglykol und 1 mM an EDTA ist, dialysiert. 3 g Protein werden auf eine Konzentration von 15 mg/ml gebracht und das 0,3fache des Volumens an 5proz. Streptomycinsulfat-Lösung unter heftigem Rühren hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren (15 Min., 13 000 g) wird der Überstand auf das 3fache Volumen verdünnt und auf eine mit dem obengenannten Puffer äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (2 • 40 cm) gegeben. Es wird mit 200 ml 0,05 M LiCl in Puffer nachgespült und die "Fraktion A" mit 500 ml 0,25 M LiCl in Puffer eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden auf 0,1 M an KPO_4 pH 7,0 gebracht und mit Ammoniumsulfat bis 80% gesättigt. Der bei 13 000 g (20 Min.) zentrifugierte Rückstand wird in wenig 0,05 M Triäthanolamin • HCl/NaOH-Puffer pH 7,5, der 0,05 M Thioglykol enthält, suspendiert und in Fraktionen auf 1 ml verteilt eingefroren. Vor dem Benutzen wird über Sephadex G 25 (Puffer 0,02 M KPO_4 pH 7,0, 0,05 M Thioglykol) entsalzt. In Eis aufbewahrt ist die entsalzte "Fraktion A" mehrere Wochen haltbar. Durch diese Prozedur wird das ACP weitgehend abgetrennt und der Blindwert bei dem Standard-Test von etwa 500 Ipm auf 15-50 Ipm gesenkt.

4. Allgemeine analytische Methoden

Die Proteinbestimmungen wurden mit der Biuret-Methode nach GORNALL (84) und UV-spektroskopisch nach WARBURG und CHRISTIAN (106) ausgeführt. Die Bestimmung sehr geringer Proteinmengen ist in Abschn. 6i (6) beschrieben.

Standard-Test der Fettsäuresynthetase von Hefe

In einem Volumen von 1 ml werden 100 μMol KPO_4 pH 6.5, 0.4 mg Serumalbumin, 10 μMol Cystein, 0.18 μMol Acetyl-CoA, 0.2 μMol TPNH und 2-5 γ Enzym 3 Min. bei 25° vorinkubiert, der Blindlauf bei 334 m μ beobachtet und mit 0.07 μMol Malonyl-CoA gestartet. 1 E = Verbrauch von 2 μMol TPNH pro Minute.

Disk-Elektrophoresen wurden nach MAURER (107, System 2) und WEBER (108, Natrium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) mit Hilfe der von WILLECKE (62) und SUMPER (67) beschriebenen Apparatur ausgeführt.

Gehaltsbestimmung von Thioestern

Acetyl-CoA wurde mit Malatdehydrogenase und Citratsynthase nach EGGERER und BUCKEL (109) bestimmt. Die Malonyl-CoA-Gehaltsbestimmung wurde mit dem optischen Test der Fettsäuresynthetase durchgeführt. Mit Ausnahme der ACP-Derivate wurden die Thioester (Acyl-CoA-Verbindungen) im Hydroxamsäuretest nach STADTMAN (88) bestimmt.

Radioaktivitätsmessung

Sie erfolgte mit Hilfe von Tri-Carb Szintillations-Spektrometern: 1. Modell 325 mit Gasdurchfluß-Zelle (zu Abb. 18), 2. Modell 313 EX (ACP-Bestimmungen) und 3. Modell 3380 mit Automatic Activity Analyzer (^3H -, ^{14}C -doppelmarkierte Proben).

Toluol-Szintillations-Lösung: Sie enthält in 1 Liter Toluol 5 g PPO und 250 mg Dimethyl-POPOP.

Dioxan-Szintillations-Lösung: Sie enthält in 1 Liter 100 g Naphthalin, 10 g PPO und 250 mg Dimethyl-POPOP.

5. zu Kapitel B I

a) NMR-spektroskopische Messung des H-D-Austausches von S-Malonyl-N-Acetylcysteamin

40 mg S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin wurden in 0.4 ml Wasser gelöst und 50 μl M K_2HPO_4 -Lösung zugegeben. An einer Mikroglaselektrode wurde der jeweilige pH-Wert

mit 0.1 M KOH eingestellt. Nach dem Lyophilisieren der Lösung wurde der trockene Rückstand mit 0.5 ml D_2O (25°C) gelöst, rasch in ein thermostatisiertes NMR-Röhrchen übertragen und in passenden Zeitabständen mit Hilfe eines NMR-Spektrometers die Flächenintegrale des Spektrums bei 25°C aufgenommen. Die Auswertung erfolgte entsprechend Abb. 6. Im Anschluß an die Messung wurde der genaue pD-Wert der Lösung bestimmt.

b) Darstellung von di-D-Malonyl-CoA

0.2 ml Mal-CoA-Lösung der Konzentration 7 mM, hergestellt nach Lit. 91, wurden in einem spitzen Zentrifugenglas lyophilisiert und der Rückstand mit 0.19 ml 99.8proz. Deuteriumoxid und 0.01 ml 0.1 N D_2SO_4 versetzt. Nachprüfung des pH muß einen Wert von 2 bis 4 ergeben. Nach 5-60 Min. bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 0.1 N KOD bis etwa pD = 6 neutralisiert und erneut lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0.2 ml D_2O gelöst.

Parallel dazu wurde die gleiche Menge der gleichen Mal-CoA-Lösung genauso behandelt, nur daß statt D_2O , D_2SO_4 und KOD H_2O , H_2SO_4 und KOH benutzt wurde. Diese H-Mal-CoA-Lösung diene als Vergleich zur D-Mal CoA-Lösung bei den optischen Testen, die in Tab. 3 und 4 zusammengefaßt sind.

c) Zum pK-Wert von S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin

Er ist nicht bekannt, wird aber aufgrund folgender Überlegung auf etwa 3 geschätzt.

Der pK-Wert der ersten Dissoziationsstufe der Malonsäure ist 2.83. Ersatz der 2. Carboxylgruppe durch die Thioestergruppe wird wegen des stärkeren elektronenziehenden Effektes den pK auf 2 bis 2.5 erniedrigen. In D_2O sind aber wegen der geringeren Basizität gegenüber H_2O die Dissoziationskonstanten niedriger. Für Chloressigsäure mit $pK = 2.76$ erhöht sich der pK-Wert um 0.44 Einheiten (110). Der pK-Wert von S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin in D_2O wird daher auf 2.5 bis 3.0 geschätzt. Da Essigsäure ($pK = 4.75$) noch 3 pH-Einheiten über dem pK-Wert, also bei pH 7.57, zu 0.1% als freie Säure vorliegt, deren Anteil mit abnehmendem pH stärker zunimmt (111), liegt in Analogie dazu die Annahme nahe, daß sich der Anteil der protonierten Form des Malonsäurethiohalbesters bei pD = 6 bemerkbar zu machen beginnt und zu einer Änderung des Austauschmechanismus führt.

6. Zu Kapitel B II

a) Synthese von β -Hydroxybuttersäure-p-phenyl-phenacylester

102 mg (0.98 mM) β -Hydroxybuttersäure wurden in einem 50-ml-Kolben mit 0.9 ml 1 N NaOH neutralisiert (bis pH 5-6). Das Wasser wurde am Rotationsverdampfer entfernt und zu dem Rückstand 246 mg (= 0.9 mM) p-Phenyl-phenacylbromid in 6 ml Äthanol zugegeben. Nach dreistündigem Sieden am Rückfluß wurde der Alkohol am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Kolbeninhalt portionsweise mit 2-3 ml wasserfreiem Aceton ausgewaschen, die Extrakte in einen 10-ml-Kolben überführt und das Lösungsmittel jeweils am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 1.5 ml Äthanol unter Erhitzen gelöst und durch eine kleine Nutsche gesaugt. Mit 0.5 ml Äthanol wurde nachgewaschen, zur heißen Lösung 0.4 ml H₂O gegeben und über Nacht auskristallisieren lassen. Die Substanz wurde im Exsiccator über CaCl₂ im Vakuum getrocknet. Ausbeute 68%, FP 99-106°.

2. Umkristallisation aus 1.2 ml Äthanol/0.3 ml H₂O. Ausbeute 60%, FP 105-106.5°.

3. Umkristallisation: 0.5 ml Toluol, erhitzt, + 0.4 ml Cyclohexan; Ausbeute 55% (gesamt), FP 111°C.

Analyse

	C	H
berechnet	72.47	6.08 %
erhalten	72.27	6.00 %

b) Gaschromatographische Analyse

α) Vorbereitung der Säulen

Waschung. 60 g Chromosorb W, 80-100 mesh, wurden in 500 ml halbkonzentrierter HCl suspendiert und in einem 1-Liter-Rundkolben 24 Stunden unter Wasserstrahlpumpenvakuum bei Zimmertemperatur auf einem sich langsam drehenden Magnetrührer stehen gelassen, die Kieselgur vorsichtig abgenutscht, mit Wasser säurefrei gewaschen und dann in 250 ml Pyridin suspendiert. Die Pyridinbehandlung erfolgte so wie die mit Salzsäure. Das gewaschene Chromosorb wurde 24 Stdn. bei 110° getrocknet.

Beladung.

1. 20 g des vorbehandelten Chromosorb wurden mit einer Lösung von 20 g NPGS in 100 ml CHCl₃ (frisch über eine Säule mit basischem Al₂O₃ gereinigt) versetzt, 1 Stde. unter schwachem Vakuum (Sieden der Suspension vermeiden) stehen gelassen und vor-

sichtig abgenutscht, mehrere Stunden an der Luft und anschließend über Nacht bei 110° getrocknet. Durch Rückwiegen des Materials wurde die Beladung bestimmt, die 19-20% betrug.

2. Analog dazu erfolgte die 26proz. Dinonylphthalat-Beladung von 0,2-0,3 mm Kieselgur.

Füllung. 1/8" Edelstahlrohr der passenden Länge wurden mit Wasser und Aceton gereinigt und auf einem Hohlzylinder in eine in den Gaschromatographen hineinpassende Spiralform gebogen. An das eine Ende des Rohres, das mit einem Quarzwollepfropf verschlossen war, wurde schwaches Wasserstrahlvakuum angelegt. Mit Hilfe eines kleinen Trichters, der durch einen Schlauch mit dem Rohr verbunden war, wurde das beladene Trägermaterial unter vorsichtigem Beklopfen der Säule eingefüllt und diese mit einem Quarzwollepfropf verschlossen. In einen Gaschromatographen montiert, wurde die Trennsäule im Heliumstrom (20 ml/min) langsam auf 190° aufgeheizt (60°/Stde.) und 24 Stdn. bei dieser Temperatur belassen.

β) Gaschromatographie

10-20 μM (1-2 mg) β-Hydroxybuttersäure (bzw. Crotonsäure bei Vergleichs-Chromatogrammen) wurden mit 150 μl TMS-Agens und 50 μl BSA versetzt. Das TMS-Agens bestand aus 8,5 ml HMDS, 4,0 ml TMCS und 12,5 ml wasserfreiem Pyridin. Nach Zusatz von BSA war die Lösung klar, andernfalls wurde BSA bis zum Verschwinden der Trübung zugesetzt. 20-100 μl dieser Mischung wurden in den Injektor eingespritzt.

Trennbedingungen

NPGS-Säule: 1/8", 1,5 m; Temperaturen: Säulenofen 110°, Injektor 200°, Detektor 250°. Trägergas Helium 25 ml/min; Dinonylphthalat-Säule: 1/8", 2 m; Temp.: Säulenofen 125°, Inj. 200°, Det. 250°. Trägergas Helium 25 ml/min.

Wärmeleitfähigkeitsdetektor; Heizstromstärke der WX-Filamente 150 mA.

γ) Radiogaschromatographie

(1) Der vom Detektorausgang kommende Gasstrom wurde mit einer heizbaren Verbindungsleitung (300°) durch ein CuO-Rohr geleitet, das im Verbrennungsöfen auf 750° gehalten wurde. Dort verbrannten die Substanzen zu $^{14}\text{CO}_2$ und H_2O (bei doppelmarkierten Verbindungen zu THO). H_2O (bzw. THO) wurde in einem mit Magnesiumperchlorat gefüllten Rohr absorbiert. Das $\text{He}/^{14}\text{CO}_2$ -Gemisch wurde durch die mit Anthracenkristallen gefüllte Durchflußzelle eines Szintillationszählers geleitet, mit dessen Hilfe die Radioaktivität bestimmt wurde durch:

1. direkte Impulszählung über dem Untergrund und

2. Aufnahme eines zum Massendiagramm parallel geschalteten Radioaktivitätsdiagramms, aus dem die Impulszahl nach der Methode "Halbwertsbreite mal Höhe" oder durch Auswerten der mitlaufenden Integratoraufzeichnung ermittelt wurde. Das die Durchflußzelle verlassende $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit einem Natronasbestrohr aufgefangen. Die Impulszahl einer Injektion wurde nach:

$$\text{IpM/Injektion} = \frac{\text{Durchfl. (Ip}_{\text{gez.}} - \text{Ip}_{\text{backgr.}})}{\text{Zellvol.}}$$

ermittelt, wobei

Durchfl. = Strömungsgeschwindigkeit des Gases,
 $\text{Ip}_{\text{gez.}}$ = die gezählten Impulse der Zählzeit t,
 $\text{Ip}_{\text{backgr.}}$ = die Impulse des Untergrundes/t,
 Zellvol. = Gasvolumen der Durchflußzelle ($\sim 8 \text{ ml}$) sind.

Bei Tritiummessung wurde die in Abb. 18, S. 32, dargestellte Anordnung benutzt. Optimale Bedingungen für ^3H -Zählung wurden bei einem Gasdurchfluß von 24 ml/min mit einem Anteil des Wasserstoffstromes von 8 ml/min erzielt. Die maximale Zählausbeute betrug 7%; von 19 000 injizierten dpm wurden nur 300 Impulse registriert. Deshalb wurde Auffangen der radioaktiven Substanz, dessen Erscheinen der Massendetektor anzeigte, am Detektorausgang des Gaschromatographen und Zählen in einem Flüssigkeitsszintillator in Augenschein genommen:

(2) Mit Hilfe einer für die "Auffangmethode" entwickelten Anthracenpatrone, deren Inhalt nach dem Absorbieren der Substanz in Toluol-Szintillationslösung suspendiert und gezählt wurde, wurden nur 30% Zählausbeute erreicht.

(3) Bei direktem Auffangen in einem mit Toluolszintillator gefüllten Auffangröhrchen (Abb. S. 32), Übertragen in ein Szintillationsfläschchen (aus Plastik; der Tritiumbackground wird auf die Hälfte oder ein Drittel gegenüber Glas gesenkt) und Auffüllen mit Szintillator auf 15 ml wird eine Zählausbeute von 70% erreicht. Die Absorption selbst erfolgt zu 90% der injizierten Menge.

6) Darstellung von Bis-trimethylsilyl- β -hydroxybuttersäure

Zu einer Mischung von 32 mMol (4.16 ml) frischdestilliertem Trimethylchlorsilan und 32 mMol (3.23 ml) Hexamethyldisilazan in 8 ml wasserfreiem Pyridin wurden bei Zimmertemperatur 15 mMol β -Hydroxybuttersäure, in 5 ml Pyridin gelöst, hinzuge-

tropft. β -Hydroxybuttersäure war analog der Aufarbeitungsvorschrift der enzymatischen Versuche (s. Abschnitt c "Aufarbeitung") aus seinem Natriumsalz durch Ansäuern, Trocknen mit Na_2SO_4 und Ausäthern hergestellt worden.) Nach einer halben Stunde bei 40° wurde der weiße Niederschlag (NH_4Cl) abzentrifugiert und die Lösung am Rotationsverdampfer unter IR-Bestrahlung eingedampft, der Rückstand in den 5-ml-Kolben einer Mikrodestille übertragen und unter Wasserstrahlvakuum destilliert, wobei zwischen Wasserstrahlpumpe und Destillationsapparatur ein $\text{CaCl}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ -Rohr geschaltet war. Bei $88\text{-}90^\circ$ (Glycerinbadtemperatur 105°) ging die Hauptfraktion über. Ausbeute 2,68 g (= 10,8 mMol) = 72%.

Die Destillation wurde wiederholt, anschließend erfolgte gaschromatographische Nachreinigung mit einer NPGS-Säule (Bedingungen s. Abb. 13). Molekulargewicht 248,48

Analyse		C	H
	berechnet	48.34	9.74 %
	erhalten	48.18	9.56 %

c) Darstellung von Crotonsäure-trimethylsilylester

Zu einer Mischung von je 11 mMol Trimethylchlorsilan in 5 ml trockenem Pyridin wurden 10 mMol (861 mg) α -Crotonsäure, in 3 ml Pyridin gelöst, hinzugeotropft. Es wurde 1/2 Stde. auf 40° erwärmt, der Niederschlag abzentrifugiert und die Lösung am Rotationsverdampfer unter IR-Bestrahlung eingengt. Bei der 2. Destillation in einer Mikrodestille ging die Hauptfraktion bei 141° über (760 Torr; Ölbad 160°).

Ausbeute 0,805 g = 52%. Molekulargewicht 158,28

Analyse		C	H
	berechnet	53.12	8.90 %
	gefunden	52.75	8.82 %

Die Nachreinigung erfolgte ebenfalls gaschromatographisch auf einer NPGS-Säule (Bedingungen s. Legende zu Abb. 13).

c) Kaliumborhydrid-Reduktion als Abfangreaktion von enzymatisch gebildetem Acetoacetylthioester

In einem Volumen von 1 ml wurden 100 μMol KPO_4 pH 7,5, 30 μMol Cystein, 5 mg FSS (1300 mE/mg), 0,36 μMol ^{14}C -Acetyl-CoA (0,42 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) 3 Minuten bei 25° vorinku-

biert, 50 μl 0.1 M KBH_4 -Lösung (5 μMol) zugegeben und mit 0.36 μMol Malonyl-CoA gestartet. Nach 1 Min. erfolgte erneut Zugabe von 5 μMol KBH_4 und nach 2 Min. Reaktionsstart wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl HClO_4 (40%) beendet. Der Überschuß an KBH_4 wird dadurch beseitigt. Es wurden 15 μMol Trägersubstanz β -Hydroxybuttersäure zugegeben, 1 Stde. bei pH 13 und 37° verseift, anschließend auf pH 9 gebracht und lyophilisiert.

Aufarbeitung: Der Rückstand wurde mit 12 N H_2SO_4 bis pH 2-3 angesäuert. Nach Zugabe von 2 ml Äther und 2 g Na_2SO_4 wurde die Suspension mit einem Glasstab durchwahlt und 20 Min. stehen gelassen. Na_2SO_4 wurde abzentrifugiert und der Ätherextrakt durch ein Faltenfilter in ein spitzes Zentrifugenglas mit Schliff abdekantiert. Es wurde noch 2-4mal mit je 2 ml Äther behandelt, das Glas in ein Wasserbad (37°) gestellt und der Äther mit einem kalten Luftstrom verblasen.

Der Rückstand wurde trimethylsilyliert (S.58) und der Radiogaschromatographie (Abb. 19) unterworfen.

d) Malonyl-CoA- $^{14}\text{CO}_2$ -Austauschreaktion zur Bestimmung von Acyl-Carrier-Protein

α) Ermittlung der optimalen Testbedingungen und Überprüfung des Testsystems

Wie in Abb. 23-27 und Tab. 11 dargestellt, wurden Abhängigkeiten von verschiedenen Parametern ermittelt. Die Ansätze enthielten 20 μMol Thioglykol in einem Volumen von 0.6 ml, andere Zusätze wie jeweils angegeben. Vorinkubation 3 Min. bei 30° . Start: 6 μM $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($2.3 \cdot 10^5$ Ipm/ μMol). Nach 15 Min. (ausgenommen Abb. 26) bei 30° wurde die Reaktion mit 0.2 ml Eisessig gestoppt und 0.2 ml auftragen auf Filterpapier ($7.5 \cdot 3$ cm), im Abzug unter IR-Lampe getrocknet und in Toluol-Szintillationslösung gezählt.

Es wurde also jeweils nur $1/4$ des Endvolumens zur Auszählung benutzt.

Mit den so ermittelten Testbedingungen zeigt die Zeitabhängigkeit Linearität bis zu 20 Min. Inkubationsdauer und eine $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung bis etwa 3 500 Ipm (pro 0.2 ml aufgetragener Lösung). Wird weniger ACP eingesetzt, z.B. 0.15 γ , ist Linearität bis zu mindestens 1 Stunde zu beobachten. Die ACP-Abhängigkeit ist ebenfalls linear bis 3 500 Ipm.

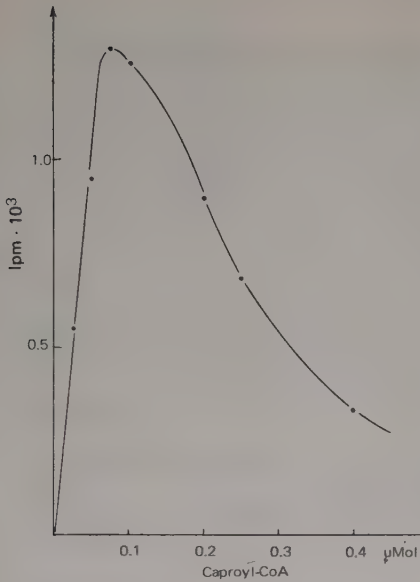


Abb. 23 Caproyl-CoA-Abhängigkeit

50 μ Mol Triäthanolamin · HCl/NaOH-Puffer, pH 7.5; 0.8 mg Enzymfraktion A, 0.9 γ ACP, 0.15 μ Mol Mal-CoA, Caproyl-CoA wie angegeben.

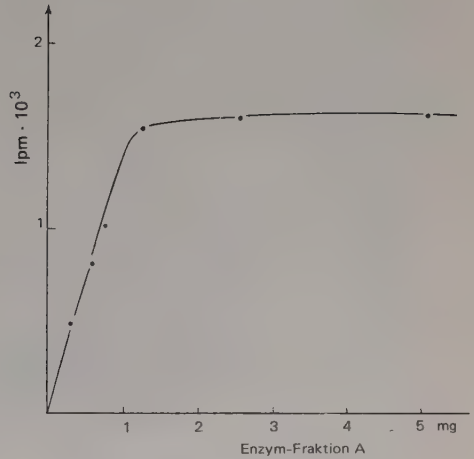


Abb. 24 Enzym-Fraktion A-Abhängigkeit

50 μ Mol Triäthanolamin · HCl/NaOH-Puffer, pH 7.5, 1 γ ACP, 75 nMol Caproyl-CoA, 0.15 μ Mol Mal-CoA, Fr. A wie angegeben.

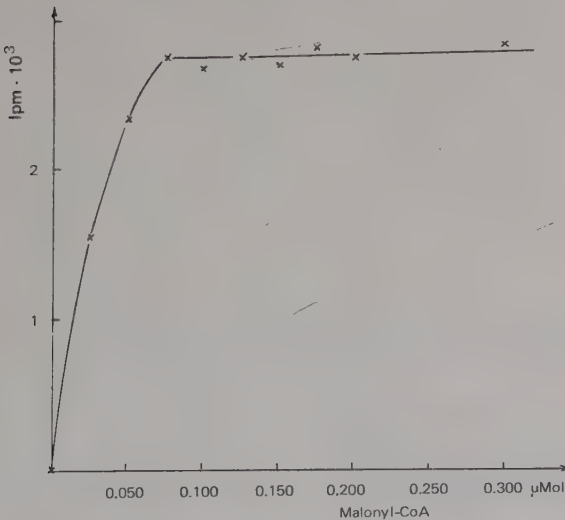


Abb. 25 Malonyl-CoA-Abhängigkeit

50 μ Mol Triäthanolamin · HCl/NaOH-Puffer, pH 7.5, Fr. A 1.3 mg, 1.3 γ ACP, 75 nMol Caproyl-CoA, Mal-CoA wie auf der Abszisse aufgetragen.

Tab. 11 Puffer-Abhängigkeit

1.3 mg Fr. A, 1.3 γ ACP, 75 nMol Caproyl-CoA, 0.1 μ Mol Malonyl-CoA, Puffer wie in Tab. angegeben.

Puffer (50 μ Mol)	pH-Wert	lpm
Imidazol/HCl	6.2	3180
Kaliumphosphat	6.2	3310
"	6.5	3700
"	7.0	3700
Triäthanolamin · HCl/NaOH	7.5	2950

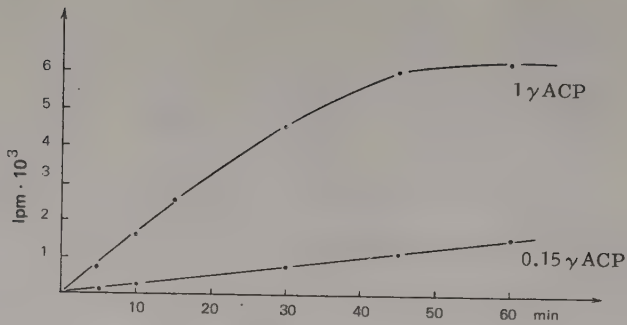


Abb. 26 Zeit-Abhängigkeit

50 μ Mol Kaliumphosphat pH 6.5, Fraktion A 1.3 mg, 1 bzw. 0.15 γ ACP, 75 nMol Caproyl-CoA, 0.1 μ Mol Malonyl-CoA: statt 15 Min. Inkubation, Zeit wie auf Abszisse angegeben.

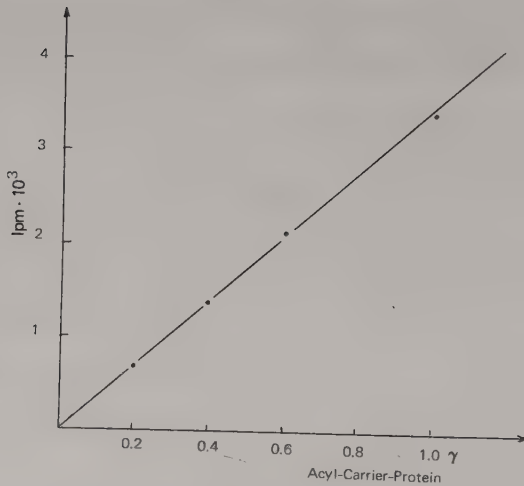


Abb. 27 Acyl-Carrier-Protein-Abhängigkeit

50 μ Mol Kaliumphosphat pH 6.5, Fraktion A 1.3 mg, 75 nMol Caproyl-CoA, 0.1 μ Mol Malonyl-CoA, Inkubation 15 Min., 0.2 bis 1 γ ACP wie angegeben.

β) Standard-Bestimmung von Acyl-Carrier-Protein

Ein Volumen von 0.6 ml enthält: 50 μMol KPO_4 pH 6.5, 20 μMol Thioglykol, 0.075 μMol Caproyl-CoA, 0.1 μMol Malonyl-CoA (wird durch 1 μMol S-Malonyl-N-acetyl-Cystein ersetzt in Messungen, die nicht zur Bestimmung der genauen spezifischen Aktivität von ACP dienen; vgl. Abb. 20), 1.3 mg Enzymfraktion A (bei Austesten von Säulenfraktionen 0.8 mg), 0.1 bis 1 γ ACP. Vorinkubation 3 Min. bei 30°. Start: 6 μMol $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($2.3 \cdot 10^5$ Ipm/ μMol). Inkubationsdauer 15 Min., 30°. Stop: 0.2 ml Eisessig. Auftragen von 0.2 ml auf Filterpapier (7.5 $\times$ 3 cm). Unter einer IR-Lampe im Abzug ($^{14}\text{CO}_2$!) trocknen. In Toluol-Szintillationslösung auszählen. (Ergab erste Zählung zu niedrige Aktivität, wurden erneut 0.4 ml auf Papierstreifen ausgezählt.)

Zur Bestimmung der genauen spezifischen Aktivität von ACP wird vor dem Test reduziert: 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5, 0.05 M Thioglykol oder DTT, 10 Min., 30°.

1 Milli-Einheit (1 mE) = 1 nMol $^{14}\text{CO}_2$ fixiert/min bei 30°.

e) Anreicherung des Acyl-Carrier-Protein

Sie lehnt sich an Arbeitsvorschriften von VAGELOS (61) und WILLECKE (62) an. Von der Firma Bayer AG wurden dankenswerterweise tiefgefrorene E.coli (hauseigener Stamm "Asparaginase") zur Verfügung gestellt. Die Anreicherung erfolgte bei 4°.

1 000 g tiefgefrorene E.coli-Suspension (15.5% Trockengewicht) wurden in 1 Liter warmem Puffer (ca. 70°) aufgetaut, der 0.01 M K-Phosphat, pH 7.0, 0.02 M Thioglykol, 1 mMol EDTA und 0.1 ml Octanol enthielt. Die Zellen tauten rasch auf, dabei kühlte sich die Suspension rasch auf etwa 0° ab. In einem "Menton Gauling Homogenizer" wurden die Bakterien aufgeschlossen (500 atm, 2maliger Durchlauf). Die Suspension durchströmte an den Ausgang der Apparatur angeschlossene Kühlschlangen, die von Eiswasser umgeben waren. Sie wurde 2 Stunden bei 13 000 g zentrifugiert. Der Überstand, auf eine Konzentration von 0.1 M an K-Phosphat pH 7.0 gebracht, wurde unter Rühren mit Ammoniumsulfat bis zu 40proz. Sättigung gebracht, 15 Min. gerührt und bei 13 000 g 30 Min. lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bis 80% gesättigt, 15 Min. gerührt und 20 Min. bei 13 000 g zentrifugiert. Die Ammoniumsulfat-Fraktion 40-75% dient zur Gewinnung der "Fraktion A" und zur Anreicherung des kondensierenden Enzyms und der β -Ketoacyl-ACP-Reduktase (Abschnitt g β und f β). Der Überstand wurde mit 6 N HCl unter Rühren auf pH 2 gebracht und noch 5 Min. gerührt, anschließend bei 3 000 g 15 Min. zentrifugiert. Der Rückstand wurde

in etwa 80 ml frisch zubereiteter 0.05 M Imidazol-Lösung, die 0.05 M an Thioglykol war, suspendiert, unter tropfenweiser Zugabe von 1 N NaOH auf pH 7 gebracht und 15 Min. gerührt. Die Suspension wurde bei 31 000 g 10 Min. zentrifugiert, der Rückstand mit 0.05 M Triäthanolamin HCl/NaOH-Puffer, 0.05 M an Thioglykol geplümpert und nochmals bei 31 000 g zentrifugiert. Die vereinigten Überstände sind "ACP, säuregefällt". (Es ist bei -15° stabil). Dieser Überstand wurde 4 Stunden gegen 10 l 0.01 M K-Phosphat-Puffer, der 0.02 M an Thioglykol war, dialysiert und die Proteinkonzentration auf 8 mg/ml gebracht. Es wurden unter schnellem Rühren 0.2 Volumen einer 5proz. Streptomycinsulfat-Lösung zugegeben und 10 Min. bei 13 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde 3 Stdn. gegen 0.01 M Piperazin/HCl-Puffer pH 6.2, 0.02 M an Thioglykol, dialysiert, mit dem gleichen Puffer auf das 3fache Volumen gebracht und auf eine DEAE-23-Cellulose-Säule (5 · 27 cm) gegeben, die mit dem Puffer äquilibriert war. Mit 200 ml Puffer wurde nachgespült, ein linearer Gradient von 0.2-0.5 M NaCl in 4 Ltr. Puffer angelegt und mit 500 ml 0.5 M NaCl in Puffer nacheluiert. Die ACP-haltigen Fraktionen wurden gesammelt und 4 Stdn. gegen 20 Ltr. 0.02 M Piperazin/HCl-Puffer pH 6.2 dialysiert. Der Cellulose-Säulenschritt wurde wiederholt mit den Änderungen: Säule: 2.5 · 30 cm, Gradient: 2 Ltr., Nachelution mit 200 ml. Die gesammelten und dialysierten ACP-Frak-tionen wurden auf eine kleine DEAE-Cellulose-Säule (0.8 · 7cm) gegeben. Das ACP wurde mit 50 ml 0.8 M NaCl im erwähnten Puffer eluiert und so in relativ konzentrierter Lösung erhalten. Diese ACP-Lösung wurde direkt (oder nach zusätzlicher Konzentrierung durch HClO_4 -Fällung (10proz. Säure) und Lösen mit 1 M NaHCO_3 bis pH 6-7) auf eine mit K-Phosphat-Puffer pH 6.5, 0.02 M Thioglykol, äquilibrierte Sephadex-G-75-Säule gegeben (2.5 · 100 cm) und mit diesem K-Phosphat-Puffer eluiert. Die ACP-haltigen Fraktionen wurden über eine kleine DEAE-Cellulose-Säule konzentriert. Das ACP war jetzt Cello-gel- und Disk-elektrophoretisch rein (Abb. 28 + 29). Die spezifischen Aktivitäten im Mal-CoA- CO_2 -Austauschtest betrugen je nach Präparation 2-3 mE/ γ ACP

Tabelle 12 Isolierung von Acyl-Carrier-Protein

	Gesamtprotein (mg)	Aktivität	
		Gesamt (E)	spezif. (mE/mg)
Ammoniumsulfatfällung Säureschritt Streptomycinsulfatfällg.	17 200	246	14.3
DEAE-Cellulose 1	861	224	260
DEAE-Cellulose 2	180	205	1 140
Sephadex-G-75	59	171	2 900

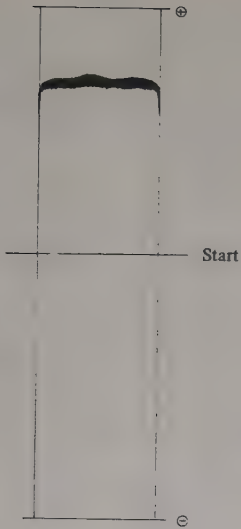


Abb. 28 Cellogel-Elektrophorese nach der Sephadex-G75-Säulenchromatographie (Lit. 108)

Puffer 0,1 M Tris/Acetat pH 7,5, bei 0°,
400 Volt, 5 mA während 30 Min.;
Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B.

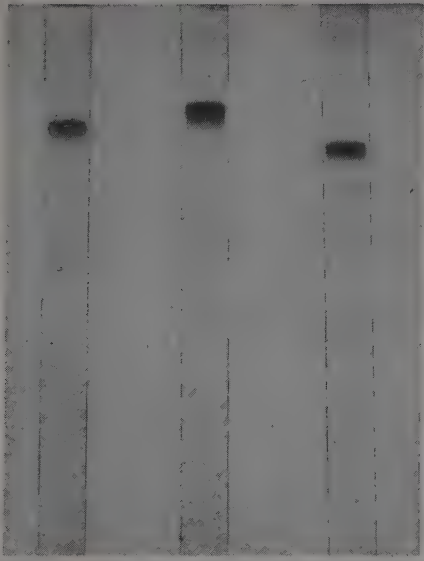


Abb. 29 Disk-Elektrophorese

Ausführung nach MAURER (102), System 2,
mit 15proz. Acrylamidgel in Tris/Glycin-
Puffer pH 8,3. Anfärbung mit 1 % Amido-
schwarz 10 B in 7 % Essigsäure.

f. β -Ketoacyl-ACP-Reduktase

α) Anreicherung

Der während der ACP-Isolierung zentrifugierte Niederschlag der Proteinfraction, die zwischen 40 und 75% Ammoniumsulfat-Sättigung ausfiel, wurde in etwa 100 ml 0.1 M K-Phosphat-Puffer pH 6.5 suspendiert und 6 Stunden gegen 10 Ltr. 0.01 M KPO_4 -Puffer dialysiert, wobei der Puffer 2mal gewechselt wurde. Die Proteinlösung wurde auf eine Konzentration von 22 mg/ml verdünnt und unter starkem Rühren mit der 0.8fachen Menge Calciumphosphat-Gel (mg : mg) zugegeben. Nach 5 Min. wurde bei 13 000 g 10 Min. lang zentrifugiert, der Rückstand mit wenig 0.1 M K-Phosphat-Puffer pH 8.0 versetzt und in einem 100-ml-Meßzylinder geplümpert, 15 Min. gerührt und 15 Min. bei 13 000 g zentrifugiert. Das Enzym ist jetzt im Überstand. Nach zweimaliger Wiederholung des Plümperns wurden die vereinigten Eluate, die 400 mg Protein enthielten, im Verhältnis 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2.5 · 50 cm) gegeben, die mit 0.01 M K-Phosphat-Puffer pH 7.0 äquilibriert worden war. Mit 200 ml dieses Puffers wurde nachgespült und die Reduktase mit einem linearen Gradienten zwischen 0 und 0.3 M NaCl in insgesamt 1000 ml 0.01 M KPO_4 -Puffer pH 7.0 eluiert. Die reduktasehaltigen Fraktionen (0.14 bis 0.19 M NaCl) wurden gesammelt und 2mal je 6 Stunden gegen 15 Ltr. 0.01 M KPO_4 -Puffer pH 7.5 dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde auf eine DEAE-Sephadex-A50-Säule (2 · 22 cm) gegeben, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Es wurde mit 100 ml Puffer nachgespült und ein linearer Gradient von 0.0 bis 0.25 M NaCl in einem Volumen von 1.2 Ltr. angelegt. Von den 180 Fraktionen war die Reduktase-Aktivität auf die der Nummer 85-100 konzentriert. Diese wurden gesammelt, gegen 0.01 M KPO_4 -Puffer pH 6.5 dialysiert und auf eine DEAE-Cellulose-Sammelsäule (0.5 · 8 cm) gegeben. Elution mit 0.5 M NaCl in 0.01 M KPO_4 -Puffer pH 6.5 ergab Fraktionen einer konzentrierten Lösung von 2 mg Protein pro ml. Diese Fraktionen wurden eingefroren bei -15° aufbewahrt und nach Auftauen direkt in die Versuche der Tab. 8 u. 9 eingesetzt. Vorher war nachgeprüft worden, daß das Natriumchlorid in dieser Konzentration keine Enzymhemmung verursacht.

Tabelle 13 Anreicherung der β -Ketoacyl-ACP-Reduktase

Anreicherungs- schritte	Gesamtprotein (g)	Aktivität		Anreicherung
		Gesamt (E)	spezifisch (mE/mg)	
Rohextrakt	104	133	1,28	1
Ammoniumsulfat- fällung	30	105	3,5	2,8
Calcium-phosphat- Gel-Schritt	10,3	82	8	6,2
DEAE-Cellulose	0,394	76	193	150
DEAE-Sephadex	0,0144	66	4 600 *	3 600

* Maximale Aktivität betrug 8 000 mE/mg

β) Standard-Reduktase-Test (β -Ketoacyl-ACP-Reduktase)

Eine Küvette (d = 1 cm) enthält im Volumen von 1 ml: 0,1 mMol K-Phosphat pH 6,5, 0,2 μ Mol TPNH und Enzym (1-10 mE). Der Blindlauf wird 2 Min. bei 334 m μ und 25° beobachtet, dann mit 10 μ Mol S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin gestartet.

1 Einheit ist diejenige Enzymmenge, die unter den Testbedingungen 1 μ Mol TPNH pro Minute umsetzt.

g) Kondensierendes Enzym (β -Ketoacyl-ACP-Synthase)

α) Die Anreicherung wurde nach GREENSPAN (79) vorgenommen, mit der Modifikation, daß statt der Sephadex-G-100-Säule eine mit Sephadex-G-200 gefüllte benutzt wurde. Sie führt zur vollständigen Abtrennung der Dehydratase.

β) Standard-Test des kondensierenden Enzyms (nach 80)

Optischer Test bei 334 m μ ; 25°; Küvette 0,25 ml; Blende 1 $\times$ 4 mm. Ein Volumen von 120 μ l enthält: 10 μ Mol KPO₄ pH 7,0, 4 μ Mol Thioglykol (oder Cysteamin), 0,1 μ Mol EDTA, je 5 m μ Mol Acetyl- und Malonyl-ACP, 2 γ β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und 20 m μ Mol DPNH (oder entsprechende Menge 1. Reduktase und TPNH). Nach 2,5 Min. Blindlauf wird mit 0,1 mg Enzymfraktion A oder 1-10 γ kondensierendem Enzym gestartet.

1 Einheit ist diejenige Enzymaktivität, durch die 1 μ Mol TPNH pro Minute oxydiert wird.

h) β -Hydroxybutyryl-ACP-Dehydratase

Sie wurde nach (83) angereichert, um den Dehydratase-Test auszuarbeiten und zu kontrollieren. Das Enzym wurde in 70proz. Ammoniumsulfat bei -15° aufbewahrt und war so mehrere Monate stabil. Unmittelbar vor dem Test wurde es über eine Sephadex-G-25 Säule ($1 \cdot 15$ cm, KPO_4 -Puffer pH 6,5) entsalzt.

Standard-Test der Dehydratase (β -Hydroxybutyryl-ACP-Dehydrase)

(Die Dehydratase ist spezifisch auf ACP-Derivate. Versuche, sie ähnlich der dehydratisierenden Teilaktivität der Hefe-Fettsäure-Synthetase durch Anwendung eines sehr großen Überschusses an S- β -Hydroxybutyryl-N-acetylcysteamin zu testen, mißlingen, selbst bei Einsatz von $40 \mu\text{Mol}$ des Modellsubstrates pro ml Testlösung.)

Es wird die Extinktionszunahme bei $263 \text{ m}\mu$ und 25° infolge Crotonyl-ACP-Bildung im Spektralphotometer M 4 Q II, Blende MT2 registriert. Küvette: Quarz, $0,5 \text{ ml}$, $d = 1 \text{ cm}$. Es ist auf Abwesenheit von freien SH-Gruppen zu achten (Reaktion mit der Crotonylgruppe).

Ein Volumen von $0,25 \text{ ml}$ enthält $25 \mu\text{Mol}$ K-Phosphat pH 6,5 und $10 \text{ m}\mu\text{Mol}$ β -Hydroxybutyryl-ACP. Start erfolgt mit $0,2\text{--}1 \text{ mE}$ Dehydratase, nachdem der Blindlauf 5 Min. verfolgt wurde. 1 Einheit ist die Aktivität, die die Bildung von $1 \mu\text{Mol}$ Crotonyl-ACP ($\epsilon = 6700$, (83)) bewirkt.

i) Acyl-Carrier-Protein-Derivate

(1) Darstellung von Acetyl-ACP

Acetyl-ACP wurde nach (112) wie folgt synthetisiert: 10 mg ACP ($\cong 1 \mu\text{Mol}$), in thio- glykolhaltiger Lösung aufbewahrt, wurde über eine Sephadex-G-25-Säule ($0,5 \cdot 15 \text{ cm}$, $0,01 \text{ M}$ KPO_4 -Puffer pH 6,5) geschickt und von Thioglykol und seinen Oxidationsprodukten befreit. Das Eluat wurde durch Perchlorsäurefällung (HClO_4 , 10%) und Auflösen in wenig 1 M NaHCO_3 konzentriert. Das ACP wurde nun mit $10 \mu\text{Mol}$ Thioglykol in 1 ml $0,1 \text{ M}$ Tris-Puffer pH 8,5 während 15 Min. bei 30° unter Stickstoff reduziert. $50 \mu\text{l}$ ($= 500 \mu\text{Mol}$) Acetanhydrid wurden zugegeben, der durchperlende Stickstoff mischte den Ansatz. Nach 5 Min. wurde Acetyl-ACP durch Perchlorsäure gefällt und mit der gleichen Sephadex-G-25 Säule von Acetylthioglykol und Salzen gereinigt. Die Ausbeuten betrugen 90 bis 100%.

(2) 1-¹⁴C-Acetyl-ACP

25 mg (2.5 μ Mol) ACP wurden, wie für die Acetyl-ACP-Darstellung beschrieben, mit 25 μ Mol Thioglykol reduziert, von Thioglykol befreit (Verdünnen auf 5 ml, Fällern mit 10proz. HClO_4 , Zentrifugieren, Lösen mit wenig 1 M NaHCO_3), erneut 10 Min. bei 30° in 1 ml 0.1 M Tris-Puffer pH 8.5 mit 10 μ Mol Thioglykol gehalten und 10 mg NaHCO_3 zugegeben. 8 μ Mol 1-¹⁴C-Acetanhydrid (etwa 30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) wurden mit flüssiger Luft im unteren Teil einer senkrecht stehenden Ampulle kondensiert und durch 216 μ Mol unmarkiertes Anhydrid verdünnt. Zu der eingefrorenen "Mischung" wurde die ACP-Lösung hinzugegeben, die Kühlung entfernt und bei Zimmertemperatur auftauen lassen. Nach Zugabe von 25 mg NaHCO_3 wurde der Ansatz noch 20 Min. in Eiswasser gestellt. Das ¹⁴C-Acetyl-ACP wurde mit 1proz. Perchlorsäure gefällt, abzentrifugiert, in 0.3 ml Wasser unter Zusatz von 1 M NaHCO_3 bis pH 6 gelöst und über eine Sephadex-G-25-Säule gereinigt. Die Ausbeute betrug 19.5 mg = 78%.

(3) Darstellung von Malonyl-ACP

15 mg (1.5 μ Mol) ACP wurden wie unter (1) beschrieben gereinigt und mit 20 μ Mol Thioglykol reduziert. Die Lösung wurde mit 10 mg NaHCO_3 und 34 mg (150 μ Mol) S-Malonyl-N-acetylcysteamin versetzt. Nach 5 Min. wurde der pH-Wert der Lösung mit weiteren 10 mg NaHCO_3 von 7.5 auf 8.5 gebracht. Unter Rühren und Einleiten von Stickstoff wurde die Mischung 40 Min. bei Zimmertemperatur belassen. Ansäuern mit 10proz. Perchlorsäure stoppte die Reaktion. Abzentrifugieren des Niederschlags, Lösen in Wasser unter Zusatz von NaHCO_3 bis pH 6 und Reinigung über eine Sephadex-G-25-Säule führte in 65proz. Ausbeute zu reinem Malonyl-ACP.

(4) Darstellung von 2-T,H-Malonyl-ACP

In einem spitzen Zentrifugenglas mit Schliff wurden 0.1 μ Mol Malonyl-ACP lyophilisiert, der Rückstand mit 88 μ l Wasser aufgenommen und 8 μ l tritiiertes Wasser (1.3 Ci/ml) zugegeben. Nach Zugabe von 4 μ l 1 N HCl wurde 2 Stunden bei 30° gehalten und anschließend mit 2-3 μ l 1 M NaHCO_3 bis pH 5-6 gebracht. Die Lösung wurde eingefroren und bei -15° aufbewahrt. Die Tritium-Markierung berechnet sich wie folgt:
 $8 \mu\text{l THO (1.3 Ci/ml)} = 10.4 \text{ mCi}$; $10.4 \text{ mCi pro Volumen von } 0.102 \text{ ml} = 101.96 \text{ mCi/ml}$
 $= 1.83 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol THO} = 4.07 \cdot 10^6 \text{ dpm}/\mu\text{Mol}$, da $1 \mu\text{Ci} = 2.22 \cdot 10^6 \text{ dpm}$. In der Malonylgruppe werden wie im Wasser zwei H-Atome markiert. Deshalb gilt die gleiche Markierung: $4.07 \cdot 10^6 \text{ dpm}/\mu\text{Mol Mal-ACP}$.

(5) Darstellung von 2-T,D-Malonyl-ACP

Unter identischen Bedingungen wurde parallel zur Tritiierung von H-Malonyl-ACP tritiiertes di-Deutero-malonyl-ACP dadurch hergestellt, daß nach dem Lyophilisieren statt 88 μ l H₂O die gleiche Menge D₂O (99.75%) zugegeben wurde. Die ³H-Markierung berechnet sich analog zu $4.46 \cdot 10^6$ dpm/ μ Mol T,D-Mal-ACP.

(101.96 mCi/ml; D₂O: 50 mMol/ml; $101.96/50 = 4.53 \cdot 10^6$ dpm/ μ Mol; wegen Zusatz von THO, HCl und NaHCO₃-Lösung ist die Inkubation nur 85% an D₂O, für die restlichen 15% gilt die obige Markierung von $4.07 \cdot 10^6$ dpm/ μ Mol; daraus folgt: $4.53 \cdot 0.85 = 3.85 + (4.07 \cdot 0.15 =) 0.61 = 4.46$, wie oben angegeben.)

(6) Darstellung von β -Hydroxy-butyryl-ACP

Es wurde entsprechend der Mal-ACP-Darstellung durch Umesterung von S- β -Hydroxy-butyryl-N-acetylcysteamin mit ACP (250 μ Mol/1 ml/1.5 μ Mol reduziertes ACP) hergestellt. Die Ausbeute betrug 60%.

(7) Proteinbestimmung von ACP und ACP-Derivaten

Die Biuret-Methode von GORNALL (84) wurde wie folgt ausgeführt: 1 ml Küvetten, d = 1 cm, werden gründlich mit Chromschwefelsäure gereinigt. In 2-ml-Reagenzgläsern werden 0.35 ml Lösung, die 5-100 γ Protein enthalten, mit 0.35 ml Biuret-Lösung versetzt und durchmischt. Nach 1/2 Stunde wird der Inhalt mit einer Pasteurpipette in die Küvette übertragen und die Extinktionsdifferenz bei 546 m μ gemessen.

(8) Thioesterbestimmung

Verzögerte Nitroprussid-Reaktion: Sie wird nach LYNEN (89) wie folgt ausgeführt.

1 ml Küvette, d = 1 cm; Volumen 0.72 ml. 0.20 ml Lösung, die 5-100 m μ Mol Thioester enthalten, 0.40 ml gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (25⁰) und 0.06 ml 2proz. Na-Nitroprussid-Lösung werden in der Küvette miteinander vermischt. Der Blindlauf wird im Photometer "Eppendorf" mit Schreiber bei 546 m μ aufgezeichnet. Nach 3.5 Min. Vorinkubation erfolgt Zugabe von 0.06 ml konzentriertem Ammoniak (d = 0.91). Es wird sofort durchmischt und die Extinktionszunahme beobachtet. In dem am häufigsten gemessenen Bereich von 5-10 m μ Mol bleibt die Extinktion nach Erreichen des Maximalwertes konstant (wenigstens für 5 Min.), erst oberhalb 20 m μ Mol sinkt sie danach wieder ab. Thioester- und Ammoniumsulfat-Lösung werden bei 25⁰, die jeweils frisch angesetzte Nitroprussid-Lösung bei 0⁰ gehalten.

Mikro-Hydroxamsäure-Test: Er wurde nach STADTMAN (88) mit 5-100 m μ Mol eines Thioesters ausgeführt. Küvette 1 ml, d = 1 cm, λ = 546 m μ . 0.25 ml Thioester-Lösung werden in 1-ml-Reagenzgläsern mit 0.1 ml Hydroxylamin (2 M, neutralisiert) versetzt und durchgemischt. Nach 10 Min. erfolgt Zugabe von 0.35 ml der sauren FeCl₃-Lösung. Das ausgefallene ACP wird 5 Min. bei 6000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand sehr vorsichtig mit einer Pasteurpipette in ein 1-ml-Reagenzglas übertragen, erneut zentrifugiert und im Photometer gegen eine ebenso behandelte Vergleichslösung ohne Thioester gemessen.

β -Hydroxybutyryl-ACP wurde nach der Hydroxamsäure-Methode, Acetyl- und 1-¹⁴C-Acetyl-ACP außerdem noch mit Hilfe der Nitroprussid-Reaktion bestimmt, deren Eichung mit S-Acetyl-N-succinyl-cysteamin vorgenommen wurde. Für den Hydroxamsäure-Test ergaben S-Acetyl-N-succinyl-cysteamin und Acethydroxamsäure identische Eichgeraden ($\Delta E = 9 \cdot 10^{-3}/10$ nMol); die für Malonyl-thioester wurden unabhängig voneinander mit (kristallisiertem) S-Malonyl-N-acetylcysteamin und mit Malonyl-CoA ermittelt ($\Delta E = 6.4 \cdot 10^{-3}/10$ nMol). Sie waren untereinander identisch, wichen aber stark von denen der Acethydroxamsäure ab. (Malonyl-CoA wurde mit FSS bestimmt. Im CoASH, das zur Darstellung von Malonyl-CoA benutzt wurde, war maximal 1% Glutathion (114), das eine Diskrepanz zwischen Thioester- und enzymatischer Bestimmung hätte verursachen können.) Um diesen Effekt zu erklären, müßte man untersuchen, ob die in Lit. 88, Fußnote 5 erwähnte Bildung von Pyrazolonen dafür verantwortlich ist.

(9) Radioaktivitätsbestimmung

Es wird ein Beispiel für die Bestimmung der spezifischen Markierung von 1-¹⁴C-Acetyl-ACP gegeben: 10 μ l ¹⁴C-Acetyl-ACP (1.23 μ Mol/ml) wurden mit 0.24 ml Wasser und 0.1 ml 2 M Hydroxylamin 10 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert. Mit 0.2 ml 10% HClO₄ wurde das ACP gefällt und 2mal in einer Tischzentrifuge bei 6000 rpm abzentrifugiert. Die proteingebundene Radioaktivität wurde so abgetrennt. Der Überstand enthielt den Anteil der ¹⁴C-Essigsäure, der vorher als Thioester gebunden war. Ihm wurden 3 Aliquote entnommen und in Dioxan-Szintillationslösung gezählt: Mittelwert 20 650 dpm. Da die Perchlorsäurefällung erst nach einigen Stunden bei verdünnten Proteinlösungen vollständig ist, wurde durch gleiche Behandlung der gleichen Menge ¹⁴C-Acetyl-ACP unter Weglassen des Hydroxylamins ein Blindwert für lösliche Radioaktivität ermittelt, der subtrahiert wurde:

$$\begin{array}{r} 20650 \\ - 1340 \\ \hline 19310 \text{ dpm}/10 \mu\text{l.} \end{array}$$

Die Berechnung ergibt eine spezifische Markierung von $1.93 \cdot 10^6/\text{ml} = 1.57 \cdot 10^6 \text{ dpm}/\mu\text{Mol} = 0.707 \mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$. Dieses $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-ACP-Präparat wurde für die Versuche der Tab. 9 verwendet.

j) Ausbeute bei der Isolierung von β -Hydroxybuttersäure aus der Inkubationsmischung und ihrer Reinigung

Jeder Schritt während der Aufarbeitung (Tab. 8 und 9, S. 44 u. 46) wurde auf seine Ausbeute hin untersucht. Dazu wurde $3\text{-}^{14}\text{C}$ - β -Hydroxybuttersäure bekannter spezifischer Aktivität benutzt. Zur Bestimmung der Gesamtausbeute (Tab. 14) wurde außerdem noch $2\text{-T-}\beta$ -Hydroxybuttersäure zugesetzt. So konnte mit dem gleichen Versuch durch Messung der Tritium-Aktivität das Ergebnis der ^{14}C -Messung überprüft werden. Beide Messungen ergaben annähernd übereinstimmend eine Ausbeute von 11-12%.

($2\text{-T-}\beta$ -Hydroxybuttersäure wurde hergestellt durch Isotopenaustausch von Acetessigsäure-methylester in tritiiertem Wasser bei pH 3, Verseifung des Esters nach (115) und Reduktion der entstandenen Acetessigsäure mit Kaliumborhydrid.)

Tabelle 14 Gesamtausbeute: ^3H - und ^{14}C - β -Hydroxybuttersäure wurden einer Inkubationsmischung entsprechend Tab. 8, S. 44, zugesetzt, die jedoch kein Acetyl-ACP, Malonyl-ACP und THO enthielt. Abstoppen der Reaktion und weitere Behandlung erfolgten wie zu Tab. 8 beschrieben.

β -Hydroxybuttersäure	^3H	^{14}C
eingesetzt (dpm)	130 000	22 000
isoliert (dpm)	15 420	2 480
" (%)	11.9	11.3

Der relativ größte Ausbeuteverlust entsteht durch Adsorption am Protein. Der Gesamtverlust verteilt sich über die einzelnen Schritte wie in Tab. 15 angegeben.

Tabelle 15 Ausbeute von β -Hydroxybuttersäure bei der Isolierung aus einer Inkubationsmischung

Aufarbeitungs-Schritt	Relative Ausbeute der einzelnen Schritte (%)	Ausbeute im Verlauf der Aufarbeitung (%)
1. Inkubation und Lyophilisieren	76	76
2. Abzentrifugieren der denaturierten Proteine	20	15
3. Ätherextraktion des angesäuerten und getrockneten Lyophilisations-Rückstandes	82	12,5
4. Gaschromatographie	92	11,5

D. Zusammenfassung

Es wurde die Kondensations-Reaktion der enzymatischen Fettsäuresynthese untersucht, bei welcher Malonyl-thioester (an "Acyl Carrier Protein" gebunden) mit Acetyl-thioester (an die kondensierende Enzymeinheit gebunden) unter Eliminierung von CO_2 und Bildung von Acetoacetyl-thioester (Acetoacetyl-ACP) reagieren. Als Modells substanz für Malonyl-Coenzym A, das Substrat der Fettsäuresynthetase aus Hefe ist, diente S-Malonyl-N-acetyl-cysteamin, um den spontanen Wasserstoff-Deuterium-Austausch an der Malonyl-Gruppe NMR-spektroskopisch zu untersuchen. Aufgrund kinetischer Daten wird für den Mechanismus des H-D-Austausches im pH-Bereich von 6-9 eine Formulierung als Protonenkatalyse vorgeschlagen. Die Halbwertszeit der Malonyl-Protonen in Deuteriumoxid beträgt $\tau_{1/2} \hat{=} 12$ Minuten im pH-Bereich des Aktivitätsmaximums der Fettsäuresynthese. Das ermöglichte den Einsatz a) von Deutero-Malonyl-CoA und Deutero-Malonyl-ACP zur Bestimmung des kinetischen Isotopeneffektes der Kondensationsreaktion, b) von H- und Tritio-Malonyl-ACP zum Studium des Protonenaustausches mit dem Lösungsmittel während der Kondensationsreaktion.

Ein einfaches, schnelles Verfahren zur Darstellung von D-Malonyl-, T,H-Malonyl- und T,D-Malonyl-CoA sowie des entsprechend markierten Malonyl-ACP werden beschrieben.

Substitution von Wasserstoff in der Malonyl-Gruppe durch Deuterium bewirkt keinen primären kinetischen Isotopeneffekt, weder bei der Umsetzung durch Fettsäuresynthetase aus Hefe, noch bei der Umsetzung durch das kondensierende Enzym aus E.coli. In Deuteriumoxid tritt bei der Fettsäuresynthese durch den Hefe-Multienzym-Komplex ein Lösungsmittel-Isotopeneffekt auf, der bei der Untersuchung der Kondensationsreaktion mit dem E.coli-Enzym dagegen nicht beobachtet wurde.

Es wird ein Verfahren zur Reinigung und Radioaktivitätsmessung von ^3H -, ^{14}C -doppelmarkierter β -Hydroxybuttersäure beschrieben.

In Versuchen mit Komponenten des Fettsäuresynthese-Systems aus Escherichia coli wurde das Produkt der (ersten) Kondensation, Acetoacetyl-ACP, als β -Hydroxybutyryl-ACP abgefangen. ^3H -, ^{14}C -Messung der isolierten β -Hydroxybuttersäure bewiesen, daß während der Kondensations-Reaktion kein Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel stattfindet.

Die Versuchsergebnisse schließen den Mechanismus einer Acylierung des enzymgebundenen Malonyl-Restes im Sinne einer Claisen-Reaktion weitgehend aus. Es wird angenommen, daß die Kondensations-Reaktion nach einem konzertierten Mechanismus abläuft, indem die Knüpfung der neuen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung mit der Spaltung der Carboxylat-Bindung der Malonylgruppe einhergeht. Das bedeutet, daß die Funktion des CO_2 -Einbaus in Acetyl-Coenzym A unter Bildung von Malonyl-Coenzym A für die Kondensations-Reaktion nicht in der Erhöhung der Acidität der an den Kohlenstoff gebundenen Protonen liegt, sondern im Ersatz eines in der Methyl-Gruppe von Acetyl-CoA relativ fest gebundenen Wasserstoffs durch die als CO_2 leichter abzuspaltende Carboxylat-Gruppe.

E. Literaturverzeichnis

1. Sonderhoff, R. und H. Thomas, Ann.Chem. 530 (1937) 195.
2. Rittenberg, D. und K. Bloch, JBC 160 (1945) 160.
3. Lynen, F. und S. Ochoa, Bioch.Bioph. Acta 12 (1953) 299.
4. Seubert, W., G. Greull und F. Lynen, Angew.Chem. 69 (1957) 359.
5. Pirson, W. und F. Lynen, Hoppe-Seyler's Z.Ph.Ch. 352 (1971) 797.
6. Lynen, F., J. cell.comp.Physiol. 54, Suppl. 1, 33 (1959).
7. Brady, R.O., Proc.Nat.Acad.Sci 44 (1958) 993;
Wakil, S.J., JACS 80 (1958) 6465.
8. Hayashi, O., JBC 215 (1955) 215;
Beinert, H. und P.G. Stansly, JBC 204 (1953) 67;
Menon, G.K.K. und J.R. Stern, JBC (1960) 253;
Vagelos, P.R., JBC 235 (1960) 346.
9. Numa, S., E. Ringelmann und F. Lynen, Bioch.Z. 343 (1965) 243;
Numa, S., M. Matsuhashi und F. Lynen, Bioch.Z. 334 (1961) 203;
Korchak, H.M. und E.J. Masoro, Bioch.Bioph.Acta 58 (1962) 354.
10. Lynen, F., Biochem.J. 102 (1967) 381.
11. Übersicht in:
Brindley, P.N., S. Matsumara und K. Bloch, Nature 224 (1969) 666;
Lynen, F. in: Miami Winter Symposia 1, S. 151, North Holland Publ. Comp.,
Amsterdam 1970.
12. Dolo, J., M.L. Ernst-Fonberg und K. Bloch, Archives Bioch. Bioph. (1971) 384.
13. Dutler, H., M. Coon, A. Kull, H. Vogel, G. Waldvogel und V. Prelog,
Eur.J.Bioch. 22 (1971) 203.
14. Lynen, F., J. Hopper-Kessel und H. Eggerer, Bioch.Z. 340 (1964) 95.
15. Lynen, F., in: M. Sela: New Perspectives in Biology, S. 1, 32, Elsivier Publ.
Comp., Amsterdam 1964.
16. Willecke, K., E. Ritter und F. Lynen, Eur.J.Bioch. 8 (1969) 503.
17. Lennarz, W.J., R.J. Light und K. Bloch, Proc.Natl.Acad.Sci. 48 (1962) 840.
18. Vagelos, P.R., P.W. Majerus, A.W. Alberts, A.R. Larrabee und G.P. Ailhaud,
Fed.Proc. 25 (1966) 1485.
19. Lynen, F., Fed.Proc. 20 (1961) 941.
20. Ziegenhorn, J., R. Niedermeier, C. Nüssler und F. Lynen, Eur.J.Biochem. 30
(1972) 285.
21. Oesterheld, D., Dissertation, Universität München (1967).
22. Sumper, M., D. Oesterheld, C. Riepertinger und F. Lynen, Eur.J.Biochem. 10
(1969) 377.
23. Bergmann, E.D., in "Organic Reaktionen" Vol. X (1959) 179.

24. Meyer, K.H., Chem.Ber. 45 (1912) 2843.
25. Autorenkollektiv der Technischen Universität Dresden, "Organikum", Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1964, S. 422.
26. Baker, R.B., und E.E. Reid, JACS 51 (1929) 1567.
27. Cronyn, M.W., M.P. Ching und R.A. Wall, JACS 77 (1955) 3031.
28. Vagelos, P.R., JACS 81 (1959) 4119.
29. Wakil, S.J., und J.Ganguly, JACS 81 (1959) 2597.
30. Lynen, F., Angew.Ch. 77 (1965) 929.
33. Biedermann, G., Dissertation, Universität Regensburg 1972, cit. in J.W. Cornforth, J.W. Redmond, H. Eggerer, W. Buckel und C. Gutschow, Nature 221 (1969) 1212.
34. Bonhoeffer, K.F. und W.D. Walters, Z.Physik.Chemie 181 (1938) 441.
35. Eggerer, H. und A. Klette, Eur.J.Bioch. 1 (1967) 447.
36. Palm, H. und D. Simon, Angew.Ch. 78 (1966) 993.
37. Marcus, A., B. Vennesland und J.R. Stern, JBC 233 (1958) 722.
38. Loewus, F.A., T.T. Tchen und B. Vennesland, JBC 212 (1955) 787.
39. Talalay, R., F.A. Loewus und B. Vennesland, JBC 212 (1955) 801.
40. Bressler, R. und S.J. Wakil, JBC 236 (1961) 1643.
41. Overath, P., G.M. Kellermann und F. Lynen; H.P. Fritz und H.J. Keller, Biochem.Z. 335 (1962) 500.
42. Glasoe, P.K. und F.A. Long, J.Phys.Chem. 64 (1960) 188.
43. Bell, R.B., "The Proton in Chemistry", London 1959, S. 161.
44. Wiberg, K.B., Chem.Reviews 55 (1959) 713.
45. Kosicki, G.W. und P.A. Srere, JBC 236 (1961) 2566.
46. Prescott, D.J. und P.R. Vagelos, JBC 245 (1970) 5484.
47. Oesterheld, D., persönliche Mitteilung.
48. Jencks, W.P., "Catalysis in Chemistry and Enzymology", McGraw-Hill Book Company, 1969, S. 273 ff.
49. Hopper-Kessel, J., unveröffentlichte Versuche.
50. Friedmann, E., Biochem.Z. 243 (1931) 125.
51. Anschütz, R., und O. Motschmann, Lieb.Ann.Ch. 392 (1912) 100.
52. Regen, D.M., C. Riepertinger, B. Hamprecht und F. Lynen, Biochem.Z. 346 (1966) 78.
53. Bush, H., R.B. Hurlbert und V.R. Potter, JBC 196 (1952) 717.
54. Karmen, A., I. McCaffrey und R.L. Bowman, J.Lipid Res. 3 (1962) 372.

55. Klein, A., Techn.Bulletin Varian Aerograph, 1966.
56. Pressmann, D., und H.J. Lucas, JACS 61 (1939) 2271.
57. Klebe, J.F., H. Finkbeiner und D.M. White, JACS 88 (1966) 3390.
58. Fischer, E.H., JACS 80 (1958) 2906; Horecker, B.L., S. Pontremolli, C. Ricci und T. Cheng, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 47 (1961) 1942; Westheimer, F.H. und G.W. Kosicki, Biochemistry 7 (1968) 4303.
59. Morhauer, K., K. Christiansen, M. Gan, M. Deubig und R.T. Kolman, J.Lip.Res. 9 (1968) 338.
60. Sumper, M., C. Riepertinger und F. Lynen, FEBS Letters 5 (1969) 45.
61. Majerus, P.W., A.W. Alberts und P.R. Vagelos, Biochem.Preparations 12 (1968) 56.
62. Willecke, K., Dissertation, Universität München, 1968.
63. Alberts, A.W., P. Goldman und P.R. Vagelos, JBC 238 (1963) 557.
64. Simoni, R.D., R.S. Criddle und P.K. Stumpf, JBC 242 (1967) 573.
65. Brock, D.J.H., und K. Bloch, Biochem.Biophys.Res.Comm. 23 (1966) 775.
66. Yalpani, M., K. Willecke und F. Lynen, Eur.J.Biochem. 8 (1969) 495.
67. Sumper, M., Dissertation, Universität München, 1970.
68. Schweizer, E., F. Piccinini, C. Duba, S. Günther, E. Ritter und F. Lynen, Eur.J.Bioch. 15 (1970) 483.
69. Majerus, P.W., A.W. Alberts und P.R. Vagelos, JBC 240 (1965) 618.
70. Mizugaki, M., G. Weeks, R.E. Toomey und S.J. Wakil, JBC 243 (1968) 3661.
71. Joshi, V.C., und S.J. Wakil, Arch.Bioch.Bioph. 143 (1971) 493.
72. Goldfine, H., JBC 241 (1961) 3864.
73. Rudney, H., P.S. Stewart, P.W. Majerus und P.R. Vagelos, JBC 241 (1966) 1226.
74. Prescott, D.J., S. Matsumura und P.K. Stumpf, Arch.Bioch.Bioph. 125 (1968) 932.
75. Matsumura, S., Biochem.Biophys.Res.Comm. 29 (1967) 437.
76. Greull, G., Dissertation, Universität München, 1973.
77. Sauer, F., E.L. Pugh, S.J. Wakil, R. Delaney und R.L. Hill, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 52 (1964) 1360.
78. "DEAE-Ionenaustauscher", Firmenschrift der Firma Pharmacia.
79. Greenspan, M.D., A.W. Alberts und P.R. Vagelos, JBC 244 (1969) 6477.
80. Alberts, A.W., P.W. Majerus und P.R. Vagelos, Biochemistry 4 (1965) 2265.
81. Toomey, E.R., und S.J. Wakil, Bioch.Bioph. Acta 116 (1966) 189
82. Vagelos, P.R., A.W. Alberts und P.W. Majerus in S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Methods in Enzymology 14 (1969) 60.
83. dgl. in Lit. 82, S. 64.
84. Gornall, A.G., C.J. Bardawill und M.M. David, JBC 177 (1949) 751.

85. Lowry, D.H., N.J. Rorebrough, A.L. Fahr und R.J. Randall, JBC (1951) 265.
86. Murphy, J.B., und M.W. Kies, Bioch.Bioph.Acta 45 (1961) 382.
87. Nagai, J., und K. Bloch, JBC 242 (1967) 357.
88. Stadtman, E.R., in S.P. Colowick und N.O. Kaplan: Methods in Enzymology 3 (1957) 228.
89. Lynen, F., Ann. 574 (1951) 33.
90. Majerus, P.W., Science 159 (1968) 428.
91. Eggerer, H., und F. Lynen, Biochem. Z. 335 (1962) 540.
92. Lienhard, G.E., und W.P. Jencks, JACS 87 (1965) 3863.
93. Barnett, R., und W.P. Jencks, JACS 90 (1968) 4199.
94. Lit. 48, S. 551.
95. Bevill, R.P., J.H. Nordin, F. Smith und S. Kirkwood, Biochem.Biophys.Res. Commun. 12 (1963) 152.
96. Rose, I.A., und E.L. O'Connell, JBC 236 (1961) 3086.
97. Englander, S.W., N.W. Downer und H. Teitelbaum, Ann.Rev.Bioch. 41 (1972) 903.
98. Eigen, M., Angew.Ch. 85 (1963) 489.
99. Wang, S.-F., F.S. Kawahara und P. Talalay, JBC 238 (1963) 576.
100. Simon, E.J., und D. Shimin, JACS 85 (1953) 2520.
101. Vogelmann, G., Diplomarbeit, Universität München, 1952.
Wessely, L., Dissertation, Universität München, 1952.
102. Decker, K., Dissertation, Universität München, 1955.
103. Schweizer, E., Dissertation, Universität München, 1963.
104. Lynen, F., in: S.P. Colowick und N.O. Kaplan, Methods in Enzymology, 14 (1969) 17.
105. Winnewisser, W., persönliche Mitteilung.
106. Warburg, O., und W. Christian, Biochem.Z. 310 (1942) 384.
107. Maurer, H., Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1968.
108. Weber, K., und M. Osborn, JBC 244 (1969) 4406.
109. Buckel, W., und H. Eggerer, Biochem. Z. 343 (1965) 29.
110. Brescia, F., und V.K. LaMer, JACS 60 (1938) 1974.
111. Müller, G.O., Praktikum der quantitativen chemischen Analyse, Herzel, Leipzig, 1957, S. 69.
112. Rose, I.A., und E.L. O'Connell, JBC 242 (1967) 1870.
113. Packard, Firmenschrift, Tri-Carb Combustion Furnace.
114. Boehringer Mannheim, Katalog "Biochemicals, Diagnostics".
115. Ljunggren, G., Biochem.Z. 145 (1924) 423.

Lebenslauf

Am 16.6.1942 wurde ich als Sohn des Landwirts Erich Arnstadt und seiner Frau Lony, geb. Schröder in Erfurt geboren.

- | | |
|-----------|---|
| 1948-1956 | Volksschule in Großvargula, Kreis Bad Langensalza/Thür. |
| 1956-1960 | Polytechnische Oberschule in Bad Langensalza |
| 1960 | Abitur |
| | Hilfsarbeiter in einem chemisch-pharmazeutischen Werk in Jena |
| | Flucht in die Bundesrepublik |
| 1961 | Abitur-Ergänzungskurs in Rottenburg a. Neckar |
| | Sonderprüfung zur Erlangung der Hochschulreife in Tübingen |
| 1962-1965 | Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br. |
| 1965 | Diplom-Vorprüfung |
| 1965-1967 | Fortsetzung des Chemiestudiums an der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg |
| 1967 | Diplom-Hauptprüfung |
| 1967/1968 | Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Chemotherapie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg unter Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Ballweg |
| 1968-1972 | Anfertigung der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Zellchemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen. |

